

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



El sistema mononuclear fagocítico en la progresión de la artritis reumatoide y de la artrosis

TESIS DOCTORAL

IVÁN PRIETO POTIN

MADRID, 2014

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



El sistema mononuclear fagocítico en la progresión de la artritis reumatoide y de la artrosis

TESIS DOCTORAL
IVÁN PRIETO POTIN
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

DIRECTORES: GABRIEL HERRERO-BEAUMONT CUENCA Y
RAQUEL LARGO CARAZO

LABORATORIO DE PATOLOGÍA OSTEOARTICULAR
IIS-FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ



INSTITUTO DE
INVESTIGACIÓN
SANITARIA
FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ



Hospital
Universitario Fundación
Jiménez Díaz



Don Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca, Doctor en Medicina y Profesor Titular de Medicina en la Universidad Autónoma de Madrid y Doña Raquel Largo Carazo, Doctora en Ciencias Químicas por la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICAN:

Que Don Iván Prieto Potin, Licenciado en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado y elaborado en el Laboratorio de Patología Osteoarticular del IIS-Fundación Jiménez Díaz, bajo nuestra dirección, la presente Tesis Doctoral.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid, a 4 de Febrero de 2014

Dr. Gabriel Herrero-Beaumont Cuenca

Dra. Raquel Largo Carazo

Doctorando Iván Prieto Potin

IIS-Fundación Jiménez Díaz. Avenida de los Reyes Católicos 2, 28040, Madrid.

A Elisa

A mi familia

A mi abuela

AGRADECIMIENTOS

Hace tiempo que la Paleopatología despertó en mí un gran apetito por el conocimiento de las enfermedades óseas humanas. Con mucha suerte tuve el privilegio de acceder al laboratorio de Patología Osteoarticular de la FJD pudiendo así continuar mis estudios pre-doctorales en el servicio de Reumatología.

Aquí he tenido el placer de conocer a mis directores de tesis, el profesor Gabriel Herrero-Beaumont y la profesora Raquel Largo, a quienes les agradezco enormemente la gran dedicación y tiempo, a mi parecer atributos muy valiosos, que habéis empleado en mi desarrollo como investigador. A ambos, os agradezco la capacidad y facilidad que tenéis para motivar a las personas para alejarse de sus zonas de confort y ampliar su aprendizaje hasta llegar a esa zona que aunque a veces da pánico, supone enfrentarte a retos interesantes. Y de alguna manera u otra, siempre conseguís que éstos sean atractivos y superables. Por eso y por muchas otras virtudes os doy las gracias.

Pero también he conocido a muchas otras personas que han contribuido en mi formación. Por ello quiero agradecer su ofrecimiento y el tiempo que han empleado en mí:

Al Dr. Jorge Román-Blas quiero agradecerle la oportunidad que me brindó para iniciarme en la redacción de publicaciones científicas. Es un verdadero placer escribir contigo y espero continuar haciéndolo.

Quiero agradecer al Dr. Santos Castañeda sus invitaciones a congresos y simposios organizados por él y junto con el profesor Herrero-Beaumont. Además de tu apoyo en los congresos internacionales, gracias por tus comentarios críticos. Echo en falta que asistas a nuestras reuniones como hacías cuando me incorporé al laboratorio.

Al Dr. Rodolfo Gómez, quiero darle las gracias por innumerables e incontables cosas, pero de especial mención, por la facilidad en la que transmites tu saber haciendo que los demás aprendan divirtiéndose.

A la Dra. Jessica Andrés, también quiero darte las gracias por infinidad de cosas, pero sobre todo, por haber compartido toda nuestra trayectoria formativa juntos, he aprendido mucho de ti.

A mis compañeros, a Marta y a Amanda, además de ser mis compañeras de mesa, por compartir conmigo siempre conversaciones enriquecedoras de cualquier nivel. Al Dr. Juan Barrasa, a Sandra y a Ane, por haber traído con vosotros conocimiento nuevo y una dinámica que nos impulsan al resto a tratar de superarnos el día a día. De todos vosotros, también aprendo gran cantidad de cosas tanto en lo profesional como en lo personal. A Rosa, por los constantes y delicados cuidados que nos das a cada uno cuando nos pasa algo y por tu trato especial con los pacientes.

A aquellas personas que pasaron temporalmente por el laboratorio, a James, a Ausra y por último a Natalia: me hubiese encantado continuar trabajando juntos, contigo también aprendí muchísimo.

A mis antiguos compañeros de laboratorio, las Dras. M^ªJosé Martínez, Laura Lugo y Lidia Tardío por todo lo que me han enseñado en el laboratorio. Y a Antonio, ¡mucho ánimo con tu redacción! No me olvido de los Dres. Bellido y Moreno-Rubio, aunque coincidimos poco tiempo, también aprendí de vosotros.

Al profesor David Walsh, por acogerme y dirigir mi estancia en el Arthritis Research UK Pain Centre. Siempre recordaré esa mañana pasando consulta en el hospital de Mansfield. Confío en que ambos laboratorios continúen colaborando en el futuro.

A los Dres. Paul Mapp y Daniel McWilliams por sus múltiples ayudas en el desarrollo de experimentación de laboratorio. También a Jane, a Debi y a Roger.

A los Dres. Victoria Chapman, Brigitte Scammell, James Burstn y Devi Sagar por sus comentarios críticos en las sesiones pre-clínicas en el Queen Medical Centre hospital.

A mis compañeros de laboratorio de la universidad de Nottingham, Laura, Lillian, Chen, Kun, Beilli, Anastasios, Ida y Manik. Gracias por acogerme tan bien y por dejarme practicar tantísimo inglés.

A la Dra. Concha de la Piedra, por tus numerosas ayudas y guías en el Laboratorio de Bioquímica Clínica del hospital. Sin ti todo habría sido más dificultoso. Gracias a la Dra. Cristina Serrano por sus enseñanzas en citometría de flujo y al Dr. Carlos Soto por sus lecciones en hematología.

Al Dr. Felipe López-Oliva, por ser la primera persona que me invita a su quirófano a presenciar un reemplazo total de rodilla explicando todos los pasos de la cirugía.

A la profesora Olga Sánchez-Pernaute, por compartir su sólida experiencia en el estudio de la membrana sinovial.

Al profesor Félix Manzarbeitia, al profesor José Fortes y al Dr. Federico Rojo por dejarme hacer uso del instrumental del servicio de Anatomía Patológica las veces que fuese necesario. También a Alberto, Ricardo y Toñi, siempre atentos a cualquiera de mis peticiones en todo lo relacionado a la histología. Por igual, a Sandra y a Raúl, siempre respondiendo en tu ayuda de inmediato.

A todos mis compañeros de la 4ª planta del edificio de investigación. Sobre todo a los investigadores del laboratorio del Dr. Pedro Esbrit, en especial a Martita, a Ana y a la Dra. Adela García, pero también a los Dres. Juan Antonio Ardura, Daniel Lozano y Sergio Portal.

A los investigadores del laboratorio del Dr. Jesús Egido, de la Dra. Del Pozo y del Dr. Vivanco. Pero también a los investigadores de la 2ª planta, al grupo de Neumología, en especial, a la Dras. Laura Del Puerto y Sandra Rial. Y a las Irenes del grupo de hormonas

Al personal del animalario de la FJD, a Pilar, a Carlos y a Juani: aún me deja maravillado el trato mágico que empleas con los animales. A Curra del laboratorio de radioisótopos, por su ayuda en la calibración y uso de los densitómetros.

A Marta Jiménez de la Fundación Conchita Rábago, por todas las gestiones inmediatas que le he solicitado todos estos años.

A los Dres. Rafael Bragado y Angel Corbí, por el aprendizaje ganado en el trabajo con los macrófagos.

También quiero agradecer a mis amigos, a mi familia, abuelos, tíos y primos, pero también a mis suegros, cuñados y sobrinos todo el apoyo que me han ofrecido cuando no he estado aquí y su comprensión en los momentos más difíciles de la redacción. A vosotros os dedico este trabajo.

A Elisa, a la vez motivadora y exigente. Me has apoyado más que nadie desde el inicio hasta el final. Sin ti no hubiese conseguido nada de esto, ni nada de lo que llevo vivido junto a ti. Te debo mucho, te debo todo. Eres la mejor persona que he conocido y por eso viviré el resto de mi vida a tu lado. Te quiero. Y a ti te dedico este libro.

Por último, quiero agradecer el apoyo incondicional que me han dado mis padres, mi hermano, mi cuñada y las niñas a lo largo de estos años. Pero sobre todo, dar las gracias a mi abuela Dolores Mayor, que siempre me ha recalado desde bien jovencito que entre mis aptitudes debía potenciar aquellas que me sirvieran para investigar. Y eso he hecho. Este trabajo va especialmente dedicado a ti.

“De lo que no se puede hablar, hay que callar”

Ludwig Wittgenstein

“Si no conozco una cosa, la investigaré”

Louis Pasteur

RESUMEN

La artritis reumatoide (AR) y la artrosis (OA) son dos enfermedades reumáticas que comparten mecanismos de lesión tisular, aun siendo de etiopatogenia completamente diferente. Mientras que la sinovitis persistente es el distintivo principal de la AR, hallazgos experimentales y clínicos sugieren que la inflamación sinovial puede estar asociada con la progresión de la OA. Las células del sistema mononuclear fagocítico (SMF) desempeñan múltiples y cruciales funciones en la sinovitis, a pesar de lo cual se desconocen otros aspectos relacionados con su diferenciación y su contribución al daño tisular.

Entre ellos, el fenotipo de las células multinucleadas gigantes, ocasionalmente descritas en la sinovitis de la AR y la OA. En este trabajo describimos la elevada frecuencia con la que están presentes estas células, la proximidad tisular de los diversos detritus que probablemente estimulan su diferenciación, así como la asociación con la intensidad de la respuesta inflamatoria.

Las células del SMF interaccionan con las diferentes estirpes celulares presentes en la sinovial inflamada, tanto las residentes como las provenientes de la sangre. En este sentido, nos preguntamos si otras células extra-sinoviales pero con participación en la patogenia de ambas artropatías crónicas pudieran tener relación con el SMF. Hemos demostrado que el condrocito puede contribuir, mediante la producción de RANKL por el cartílago y, posterior incremento de la osteoclastogénesis subcondral, a la osteopenia yuxta-articular de la AR.

Los factores de riesgo cardiovascular tradicionales, junto con la inflamación sistémica, empeoran la progresión de la arteriosclerosis en la AR. Hemos observado que uno de los componentes del síndrome metabólico, la hipercolesterolemia, también empeora la progresión de la sinovitis reumatoide y la destrucción peri-articular erosiva por un incremento de la osteoclastogénesis.

En conjunto, estos resultados resaltan la importancia del SMF en la artritis crónica siendo una diana potencial para el tratamiento de la sinovitis en AR y en OA.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA) are two rheumatic diseases sharing tissue lesions mechanisms, despite of their completely different etiopathogenesis. While persistent synovitis is the main hallmark of RA, experimental and clinical findings suggest that synovial inflammation may be associated with OA progression. Mononuclear phagocyte system (MPS) cells take on multiple and crucial functions within the inflamed synovium, however other aspects of its differentiation and contribution to tissue damage remain poorly understood.

Among them, multinucleated giant cell (MGC) phenotype which has occasionally been described in rheumatoid and osteoarthritis synovitis. In this study, we first aimed to describe the high frequency with which these cells are present, the close proximity to specific tissue debris probably stimulating its differentiation and its association with the intensity of the inflammatory response.

The cells of the MPS interplay with a large variety of synovial cells, both resident and resulting from blood. We wonder whether other extra-synovial cells, also participating in the pathogenesis of both chronic arthropathies, could be associated with the MPS. We have demonstrated how articular chondrocytes may contribute to yuxta-articular bone loss in RA, by producing RANKL in cartilage and subsequently increasing subchondral osteoclastogenesis.

The increase of traditional cardiovascular risk factors, along with systemic inflammation, impairs atherosclerosis in RA. We have observed how one of the components of the metabolic syndrome, hyperlipidemia, impairs rheumatoid synovitis progression and periarticular erosive destruction by increasing osteoclastogenesis.

Overall results point out the relevance of the MPS in chronic arthritis suggesting that these cells are a potential target for reducing synovitis in RA and OA.

ÍNDICE

I.	Introducción	1
1.	Patogenia de la Artritis Reumatoide y de la Artrosis	2
2.	Comparación de la sinovitis reumatoide con la artrósica	9
3.	El Sistema Mononuclear Fagocítico.....	11
3.1.	EL sistema monocito/macrófago en la AR y en la OA	12
3.2.	Tipos de Células Multinucleadas Gigantes.....	14
3.3.	Células Multinucleadas Gigantes en membrana sinovial AR y OA.....	15
3.4.	Comunicación condrocito-células del SMF: el cartílago inflamado en el remodelado subcondral.....	16
3.5.	Incremento del remodelado subcondral por osteoclastogénesis y su efecto sobre el deterioro progresivo del cartílago en la OA.....	18
4.	El colesterol como factor estimulante de la actividad del SMF en enfermedades inflamatorias crónicas	19
4.1.	Las células mononucleares de sangre periférica como transmisores de la inflamación sistémica a los tejidos	20
4.2.	Activación del SMF por la hipercolesterolemia.....	20
II.	Objetivos.....	22
III.	Materiales y métodos.....	25
1.	Estudios en humanos	26
2.	Estudios en animales	26
2.1.	Animales.....	26
2.2.	Modelo de artritis inducida por antígeno (AIA) suplementado con dieta de alto contenido graso	27
2.3.	Modelo de artrosis	29
3.	Estudios en sangre.....	31
3.1.	Extracción de suero	31
3.2.	Extracción de células mononucleares de sangre periférica	31
4.	Análisis radiográfico y medida de la densidad mineral ósea.....	32
5.	Estudios histopatológicos.....	33

5.1.	Procesamiento de tejidos.....	33
5.2.	Valoración de sinovitis por score de Krenn.....	34
5.3.	Identificación de células multinucleadas gigantes.....	35
5.4.	Valoración de daño del cartílago articular por score de Mankin.....	35
5.5.	Valoración del espesor del hueso subcondral.....	36
5.1.	Valoración de pannus invasivo.....	36
6.	Inmunohistoquímica y ensayo de actividad enzimática.....	38
7.	Estudios de expresión génica	41
8.	Estudios de proteínas por Western Blot	41
9.	Análisis estadístico	42
IV.	Resultados	43
1.	Células multinucleadas gigantes de la membrana sinovial de pacientes con AR y con OA	44
1.1.	Demografía y datos clínicos de la población de estudio	44
1.2.	Células multinucleadas gigantes de la sinovial humana	45
1.3.	Caracterización de las MGC sinoviales humanas	47
1.4.	Inflamación sinovial y densidad de las MGC	51
2.	El RANKL sintetizado por los condrocitos articulares contribuye a la pérdida de hueso yuxta-articular en la artritis crónica	53
2.1.	Pérdida ósea yuxta-articular	53
2.2.	Osteoclastogénesis por medida directa de tinción TRAP.....	56
2.3.	Valoración histológica del daño del cartílago articular	57
2.4.	Expresión proteica del RANKL y de la OPG.....	59
2.5.	Localización del RANKL y la OPG en el cartílago articular	61
3.	La hipercolesterolemia incrementa la destrucción articular en la artritis crónica. Modelo experimental agravado por la infiltración de células espumosas	63
3.1.	Perfil metabólico	63
3.2.	Niveles de CRP.....	64
3.3.	Aumento de la sinovitis	65

3.4.	Infiltrado masivo de macrófagos y presencia de células espumosas.....	67
3.5.	Presencia de células multinucleadas reabsorbiendo tejido adiposo	70
3.6.	Incremento de la angiogénesis	72
3.7.	Incremento de la resorción ósea.....	74
3.8.	Incremento de la expresión génica de TNF- α y MCP-1	76
3.9.	Incremento de la expresión proteica del RANKL en la sinovial.....	76
3.10.	Caracterización de las células mononucleares de sangre periférica.....	78
V.	Discusión.....	80
1.	Células multinucleadas gigantes de la membrana sinovial de pacientes con AR y con OA	81
2.	El RANKL sintetizado por los condrocitos articulares contribuye a la pérdida de hueso yuxta-articular en la artritis crónica	84
3.	La hipercolesterolemia incrementa la destrucción articular en la artritis crónica. Modelo experimental agravado por la infiltración de células espumosas	87
VI.	Conclusiones.....	91
VII.	Bibliografía.....	93
VIII.	Aportaciones científicas	118
IX.	Addenda	121

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Pannus sinovial en cóndilo femoral de conejo con artritis inducida por antígeno (AIA).
- Figura 2. Histopatología del cartílago articular femoral de conejo con OA.
- Figura 3. Modelo animal de AIA por inmunización a OVA.
- Figura 4. Modelo animal de OA inducido por menisectomía parcial medial y sección del ligamento cruzado anterior.
- Figura 5. Densitómetro Hologic QDR-1000 y sistema Philips Diagnost93
- Figura 6. Metodología aplicada para la valoración histológica del espesor del hueso subcondral y del pannus sinovial en cóndilos femorales de conejo.
- Figura 7. Metodología empleada para la cuantificación de la osteoclastogénesis en el hueso subcondral.
- Figura 8. Morfología y afinidad por dianas específicas de las MGC en sinovitis humana.
- Figura 9. Caracterización de las MGC en membrana sinovial AR y OA.
- Figura 10. Marcadores específicos para las MGC.
- Figura 11. Histopatología de la membrana sinovial humana AR y OA.
- Figura 12. Evaluación radiológica y densitométrica de la pérdida ósea yuxta-articular.
- Figura 13. Valoración histológica del espesor del hueso subcondral.
- Figura 14. Osteoclastogénesis subcondral por medida directa de tinción TRAP.
- Figura 15. Valoración histológica del daño en el cartílago articular.
- Figura 16. Detalle de la integridad de la *tidemark*.
- Figura 17. Expresión del RANKL y de la OPG en cartílago articular, hueso subcondral y membrana sinovial.
- Figura 18. Patrón de distribución del RANKL y de la OPG en el cartílago articular.
- Figura 19. Concentración de proteína C reactiva en $\mu\text{g/mL}$ en el suero de los conejos experimentales.
- Figura 20. Histopatología de la membrana sinovial.
- Figura 21. Inmunotinción de los macrófagos sinoviales.
- Figura 22. Detalle del infiltrado sinovial.
- Figura 23. Células multinucleadas gigantes absorbiendo tejido adiposo.

Figura 24. Inmunotinción de la angiogénesis sinovial.

Figura 25. Resorción ósea activa.

Figura 26. Expresión génica de TNF- α y MCP-1 en la membrana sinovial.

Figura 27. Efecto de la dieta hiperlipidémica en la expresión proteica del RANKL.

Figura 28. Absorción de partículas lipídicas por células mononucleares de sangre periférica.

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En muchos casos se ha conservado la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

ABC	Complejo avidina-biotina unido a peroxidasa
ACLT	Sección del ligamento anterior cruzado
AIA	Artritis inducida por antígeno
AR	Artritis reumatoide
AT	Arteriosclerosis
BMD	Densidad mineral ósea
BMP	Proteína ósea morfogénica
CCR	Receptor para quimiocina
CRP	Proteína C reactiva
CTX-I	Telopéptido C-terminal de colágeno tipo I
DAB	Diaminobenzidina
DXA	Absorciometría de rayos x de doble energía
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FA	Formaldehído
FBGC	Célula multinucleada gigante de tipo cuerpo extraño
HDL	Lipoproteína de alta densidad
H-E	Hematoxilina y eosina
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico
HFD	Dieta de alto contenido graso
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IFN- γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LGC	Célula multinucleada gigante tipo Langhans
LPS	Lipopolisacárido

MCP	Proteína quimioatrayente de monocitos
M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos
MetS	Síndrome metabólico
MGC	Células multinucleadas gigantes
MMP	Metaloproteinasa
MΦ	Macrófago
OA	Artrosis
OAI	Artrosis inflamatoria
OANI	Artrosis no inflamatoria
OPG	Osteoprotegerina
OVA	Ovalbúmina
oxLDL	Lipoproteína oxidada de baja densidad
PAS	Ácido periódico de Shiff
PG	Prostaglandina
PGC	Célula multinucleada gigante tipo plasmática
PM	Post-mortem
RANKL	Ligando del receptor activador para el factor nuclear κB
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SMF	Sistema mononuclear fagocítico
TGC	Célula multinucleada gigante tipo Touton
TGF	Factor de crecimiento transformante
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAP	Fosfatasa ácida tartrato resistente
VCAM	Molécula de adhesión celular vascular
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

I. Introducción

1. Patogenia de la Artritis Reumatoide y de la Artrosis

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune caracterizada por una poliartritis con manifestaciones sistémicas y una elevada y grave morbilidad. La AR afecta del 0,5 al 1% de la población mundial, ocasionando una disminución en la calidad de vida, importante discapacidad física y un cuantioso coste económico [176]. En España, la prevalencia de la AR es del 0,5%, siendo más frecuente en mujeres que en hombres y más elevada en personas de áreas urbanas que de zonas rurales [31,32]. La expresión clínica de la enfermedad es muy variada, abarcando desde formas auto-limitadas a otras muy agresivas, que experimentan una rápida evolución que culmina con la destrucción de la articulación afectada y la consiguiente limitación funcional. Los estudios genéticos han confirmado la existencia de un sustrato genético, asociado en parte a determinados genes codificadores de proteínas que participan en la respuesta de los linfocitos T. Estos hallazgos refuerzan la importancia del papel atribuido a las células T en el inicio y perpetuación anómala de la respuesta inmune en esta enfermedad [39].

La patogenia de la AR es compleja y en ella intervienen diferentes poblaciones celulares implicadas en la respuesta inmune innata y adquirida. En su patogenia participan células residentes en la membrana sinovial, como los sinoviocitos B de la estirpe fibroblástica y los de tipo A o macrófagos (MΦ) de la íntima, así como las células inflamatorias procedentes de la sangre como los linfocitos T, los linfocitos B y los monocitos. Todas ellas contribuyen a la transformación agresiva del fenotipo de los sinoviocitos B y al desarrollo de un intenso infiltrado inflamatorio cuyo resultado final es una hiperplasia sinovial persistente, capaz de destruir el cartílago articular y producir erosiones óseas [57,133]. La liberación de efectores inflamatorios, como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , el interferón (IFN)- γ , y las interleucinas (IL)-1, IL-6 e IL-17 [179], activa a su vez a monocitos, MΦ y fibroblastos, dando lugar a la inflamación crónica de la sinovial, que termina adquiriendo un fenotipo invasivo, denominado pannus. En él predominan principalmente los MΦ, distribuidos ampliamente en la capa íntima y subíntima, y las células de tipo fibroblasto cuya

presencia es más frecuente en las zonas más superficiales. Los MΦ expresan marcadores de superficie característicos como el CD11b, el CD14, el CD16 o el CD68 mientras que los fibroblastos expresan con intensidad la molécula de adhesión vascular (VCAM)-1 y la caderina-11, siendo la adhesión celular la principal característica invasiva de este tipo celular que permite un perfecto anclaje a los componentes de la matriz cartilaginosa. Estos fibroblastos producen colagenasas tipo metaloproteinasas (MMP)-1, estromelisininas como la MMP-3, gelatinasas, agreganasas y alguna cisteína proteasa como la cathepsina L que degradan los componentes de la matriz extracelular y por tanto se consideran responsables de la destrucción del cartílago articular [13,67]. La sinovial inflamada se adhiere y recubre los bordes del cartílago articular, destruyéndolo progresivamente y penetrando en el hueso [180] (Figura 1). Mientras que la acción de estas proteinasas resulta ser el causante principal de la degeneración del cartílago, tendones y ligamentos en la AR, la destrucción del hueso requiere por su parte la eliminación de matriz ósea mineralizada. En la unidad de remodelado óseo fisiológica, el osteoclasto es la célula encargada de la resorción del hueso. Este proceso requiere del estímulo del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) y del ligando del receptor activador para el factor nuclear κB (RANKL). Más adelante se comentará en detalle la importancia del RANKL en la osteoclastogénesis de la artritis crónica. El osteoclasto se caracteriza por la expresión de enzimas proteolíticas que degradan la matriz mineralizada, como la cathepsina K, la MMP-9 y la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), así como receptores de calcitonina y de vitronectina [27,188]. Se trata de una célula especializada que se adhiere a la superficie ósea mediante un acoplamiento ajustado vía la interacción de integrinas de la membrana con componentes de la matriz, como la sialoproteína o la osteopontina. La creación de un sellado hermético permite al osteoclasto generar un ambiente acidificado a través de la acción de anhidrasas carbónicas y de bombas de protones que junto con la liberación de enzimas proteolíticas lisosomales producen la degradación de los componentes de la matriz ósea. Los osteoclastos son también las células efectoras responsables de las erosiones óseas. Estas se producen en los sitios dónde la sinovial se encuentra en contacto directo con el hueso. En la sinovial reumatoide se detectan concentraciones elevadas de RANKL que junto con la

osteoprotegerina (OPG) constituyen los determinantes finales del remodelado óseo. Además, también se producen múltiples citocinas que son capaces de acelerar la actividad osteoclastogénica, entre ellas el M-CSF, la IL-1, la IL-17 y el TNF. Tanto las células sinoviales de tipo B como las células T son, por este mecanismo, contribuidoras esenciales a la activación osteoclástica en la sinovial inflamada. Una de las características de la erosión reumatoide es la ausencia de reparación perilesional. Tradicionalmente, se ha atribuido a la actividad inflamatoria local un efecto negativo sobre la actividad de los osteoblastos presentes en la proximidad de la erosión. El proceso inflamatorio de la AR afecta a la capacidad del osteoblasto para formar hueso mineralizado, disminuyendo la formación de osteoblastos maduros y contribuyendo a una pérdida neta de hueso y al fallo reparativo óseo en las zonas de erosión [196]. Aunque la utilización de fármacos bloqueantes específicos de los mediadores pro-inflamatorios de la artritis reumatoide, como los inhibidores de TNF o de la IL-6, ralentizan la evolución de la erosión, en escasas situaciones logran desencadenar cambios reparativos [55,120].

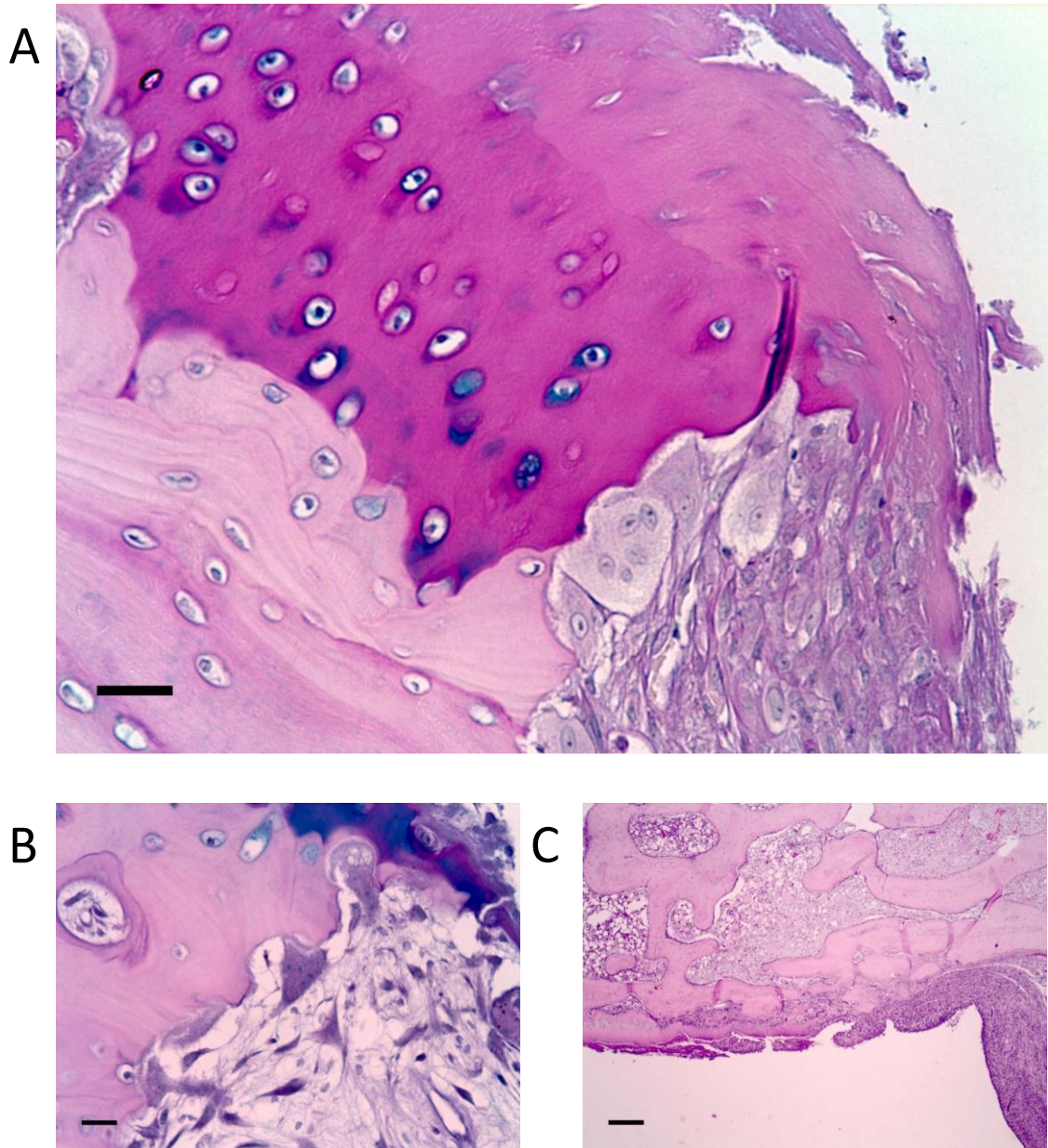


Figura1. Pannus sinovial en cóndilo femoral de conejo con artritis inducida por antígeno (AIA). A, región de intersección entre el pannus sinovial, el hueso y el cartílago calcificado. Nótese la presencia de células multinucleadas gigantes en contacto con la superficie mineralizada. Tinción azul alcian-PAS, escala = 25 μ m. B, lagunas de resorción ósea y osteoclastos con la estructura típica de ribete en cepillo, obsérvese las lagunas de resorción que darán lugar a las erosiones óseas. Tinción azul alcian-PAS, escala = 25 μ m. C, recubrimiento del cartílago articular por el pannus sinovial. Tinción hematoxilina-eosina, escala=200 μ m.

La artrosis (OA) es una enfermedad articular muy frecuente en la población española, con una prevalencia estimada del 10% en rodilla y del 6% en manos, siendo más frecuente en mujeres que en hombres. Su pico más elevado alcanza el 33% en individuos con OA de rodilla de edad comprendida entre los 70-79 años [31,53]. La OA origina además de una gran morbilidad y malestar a los enfermos que la sufren, un enorme gasto social tanto en atención sanitaria como en incapacidades laborales. Se clasifica en primaria o secundaria. La primaria es el tipo más común y aunque su etiología es incierta se han identificado varios factores que podrían influir en la aparición de la enfermedad como la edad, una predisposición genética, el sexo, la obesidad y el alineamiento articular [1]. Por su lado, en la OA secundaria, con cuadros clínicos muy similares a los de la OA primaria, se reconoce una causa directa origen de la enfermedad, como pueden ser algunas enfermedades metabólicas, anomalías anatómicas groseras, traumatismos violentos generadores de articulaciones inestables, secuelas de artritis inflamatorias en remisión y muchas otras. Se ha propuesto una clasificación alternativa de la OA basada en los hallazgos clínicos y etiopatogénicos más recientes, y que incluiría tres subgrupos: uno determinado genéticamente, otro dependiente de hormonas estrogénicas y por último un tercero relacionado con el envejecimiento [34,81]. Además de permitir un mejor conocimiento de la etiología de la enfermedad, la búsqueda de fenotipos concretos permitiría una aplicación terapéutica más eficaz. La OA asienta en las articulaciones diartrodiales, en las que se produce una pérdida focal, progresiva del cartílago acompañada por una reacción hipertrófica (esclerosis) en el hueso subcondral y formación de hueso nuevo (osteofitos) en los márgenes de la articulación, en un intento reparador del tejido óseo y, en casos avanzados, por una reacción inflamatoria moderada [48]. Varios factores están involucrados en este proceso, como la sobrecarga mecánica, los bioquímicos y los genéticos.

La OA supone un fracaso en la síntesis de una matriz extracelular de buena calidad por los condrocitos, que son incapaces de mantener el equilibrio homeostático entre la síntesis y la degradación de sus componentes. Estas lesiones son el resultado de varias fases histológicas. En una primera fase, el cartílago pierde su aspecto liso y homogéneo. En su interior se produce una pérdida focal de condrocitos, que se alterna

con otras zonas en las que existe proliferación. A continuación, se forman fisuras en la matriz que según progresan se transforman en profundas hendiduras verticales que alcanzan el hueso subcondral. En los bordes de estas hendiduras se produce una proliferación celular reparativa con la formación de agrupaciones condrocitarias ,denominadas clonas, que expresan marcadores de diferenciación hipertrófica (colágeno X, MMP-13, fosfatasa alcalina, el factor de transcripción runx-2, entre otros [103]) (Figura 2). Estos liberan a su vez enzimas proteolíticas (MMP y agrecanasas) que degradan la matriz, factores de crecimiento (factor de crecimiento transformante (TGF)- β y proteína ósea morfogenética (BMP)-2) que favorecen el crecimiento de excrecencias óseas, citocinas (IL-1 β , TNF- α) y mediadores inflamatorios (óxido nítrico y prostaglandina (PG) E2) que afectan al propio tejido y a los circundantes, como la membrana sinovial [117,170,184]. Finalmente, la desintegración progresiva del cartílago expone el hueso subcondral a la cavidad articular, al tiempo que los fragmentos de tejido liberados a la cavidad articular terminan configurando cuerpos libres osteocartilaginosos. Éstos participan en la respuesta inflamatoria observada en la sinovial artrósica, dando lugar a un infiltrado linfoplasmacitario y macrofágico con sobre-expresión de mediadores pro-inflamatorios.

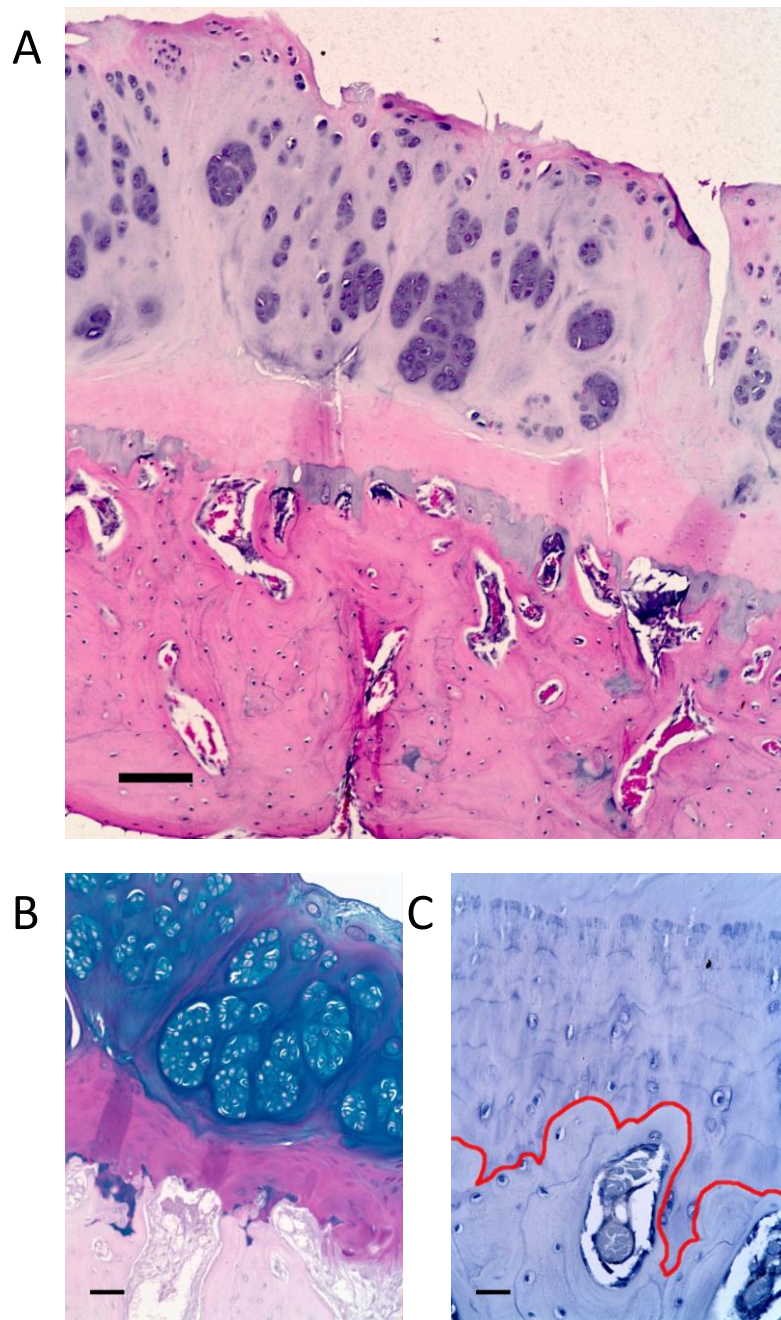


Figura2. Histopatología del cartílago articular femoral de conejo con OA. A, desorganización completa de la estructura típica, con hipocelularidad, hendiduras que alcanzan las capas más profundas del cartílago no calcificado y formación de grupos de condrocitos hipertróficos. Tinción hematoxilina y eosina, escala = 50 μ m. B, detalle de varias clonas condrocitarias. Tinción azul alcian-PAS, escala = 25 μ m. C, vascularización y duplicidad de la *tidemark*, la línea roja delimita la separación del cartílago calcificado con el hueso subcondral dónde se observan estructuras vasculares. Tinción hematoxilina, escala = 100 μ m.

Hasta hace pocos años, la OA se definía como una enfermedad degenerativa del cartílago articular, dado que en este tejido se produce un marcado deterioro estructural, caracterizado en los estadios iniciales por lesiones focales y superficiales que durante la progresión del proceso se generalizan afectando a todo el espesor del cartílago, que llega a desaparecer por completo dejando expuesto el propio hueso subcondral. Sin embargo, este concepto se ha modificado considerablemente en los últimos años. Hoy día, se considera a la OA una enfermedad global de la articulación en la que están involucrados no solo el cartílago, sino también el hueso subcondral y la membrana sinovial, además del resto de estructuras articulares y periarticulares: cápsula articular, meniscos, tendones, ligamentos y musculatura periarticular. Así, hoy se define la OA como una enfermedad de órgano, donde existe una insuficiencia o fracaso global de la estabilidad y funcionalidad articular en su conjunto [117].

Clásicamente y por muchas razones la OA no ha sido considerada una artropatía inflamatoria. Ni las manifestaciones clínicas muestran un cortejo sintomático tan intenso como el de las artritis inflamatorias: como la gota o la artritis reumatoide; ni la respuesta inflamatoria a nivel tisular y en el líquido sinovial es tan violenta como la de la AR, además de la ausencia casi completa de inflamación sistémica [16]. No obstante, desde hace unos años diferentes hallazgos clínicos y experimentales han mostrado que la contribución de la sinovitis artrósica es clave para entender su patogenia. De hecho, varios trabajos han mostrado que la intensidad de la sinovitis tiene una relación con el progreso del daño en el cartílago en la OA, al tiempo que se ha evidenciado una expresión elevada de citocinas pro-inflamatorias, MMP y moléculas de adhesión celular [60]. Se han descrito distintos tipos de sinoviopatías en la progresión de la enfermedad: la hiperplásica, la inflamatoria, la fibrosa y la asociada a detritus [2].

2. Comparación de la sinovitis reumatoide con la artrósica

La intensidad inflamatoria de la sinovitis en la OA es muy variable, siendo en la mayoría de los casos más leve que la observada en la AR, aunque en ocasiones la

inflamación crónica está marcada por la formación de verdadero pannus. Por otro lado, con frecuencia, se producen brotes inflamatorios durante el progreso de la enfermedad, histológicamente indistinguibles de los observados en la AR. Aun así, el origen es completamente diferente, siendo el de la AR de carácter autoinmune, mientras que el de la OA se atribuye a factores biomecánicos como la presencia de micro-cristales en el líquido sinovial, sobre todo de pirofosfato cálcico, estrés y sobrecargas mecánicas continuadas y la absorción de restos de cartílago [16,169].

La sinovitis reumatoide se caracteriza por un infiltrado de células mononucleares que modela la estructura del tejido mediante la hiperplasia y proliferación de la capa íntima, la formación de tejido fibroso y la neovascularización [168]. Como resultado se desarrolla un tejido que por su agresividad tisular y la invasividad de tejidos adyacentes pudiera asemejar al comportamiento de la expansión tumoral [56]. En la articulación normal, la capa íntima solamente alcanza entre una y dos capas de profundidad, mientras que en la AR, ésta puede alcanzar entre 4 y 10 capas de espesor.

La angiogénesis es un proceso dinámico que aporta soporte estructural así como nutrientes a la sinovial invasiva en expansión. Diversos factores pro-inflamatorios como la IL-8, el factor de crecimiento de fibroblastos y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) favorecen el aumento de la expresión de angiopoyetinas por parte de los sinoviocitos y en consecuencia incrementan la proliferación vascular [56]. El estudio del infiltrado inflamatorio sinovial, según marcadores específicos para células inmunes CD15 (células plasmáticas), CD68 (MΦ), CD3 (linfocitos T), CD20 (linfocitos B) y CD38 (neutrófilos), ha confirmado que las poblaciones mayoritarias en la AR son los MΦ, las células T y las células plasmáticas, estando también presentes en menor medida las células B y los neutrófilos [14]. Pese a que los neutrófilos son abundantes en los derrames de líquido sinovial, rara vez se observan en la sinovial reumatoide.

Mientras que la sinovitis constituye la base de la patogenia de la AR, hallazgos experimentales, tanto clínicos como de imagen por resonancia magnética, ultrasonografía o artroscopia [169], sugieren que la inflamación de la sinovial contribuye decisivamente a la progresión del daño articular en la OA. Durante la

progresión de la enfermedad se activan determinados mecanismos compartidos con la respuesta inmune en la sinovial OA. Entre éstos se encuentran las células del linaje monocito/macrófago que producen citocinas inflamatorias como el TNF- α o la IL-1 β , así como la activación del complemento [74,116]. Probablemente como consecuencia de la contribución mecánica, la sinovitis artrósica también se caracteriza por un engrosamiento de la capa íntima, fibrosis, un aumento de la neovascularización y la aparición de depósitos de fibrina.

Varios estudios han comparado el tejido sinovial de pacientes AR con el de OA encontrando un perfil similar en la expresión de citocinas pro- y anti-inflamatorias [59] e infiltrados inflamatorios, pero de menor intensidad en la OA que en la AR [149]. En la sinovial OA, los M Φ son las células dominantes, seguidas de las células T [14]. Existe un tipo celular llamado mastocito que aparece con mayor frecuencia en la sinovial OA en comparación con la AR, pero se desconoce con exactitud cuál es su papel [108]. Como hemos comentado previamente, en ocasiones se forma un pannus sinovial en formas avanzadas de la enfermedad, preferentemente en zonas marginales con fuerte expresión de IL-1 β y MMP-3, sugiriendo una contribución a la destrucción del cartílago articular [203]. Este pannus artrósico se ha clasificado en dos tipos, uno vascular, definido por hiper celularidad e hipervascularización en el que se distingue claramente el borde que separa cartílago de pannus; y otro fibroso avascular, caracterizado por hipocelularidad y una unión indistinguible entre cartílago y pannus [171]. El infiltrado celular linfocitario es frecuente en la sinovitis OA, aunque de distribución más parcheada y de menor intensidad que el existente en la AR [59,159].

3. El Sistema Mononuclear Fagocítico

Originalmente, los M Φ se clasificaron según su capacidad fagocítica [187]. Así, el término M Φ , del griego gran comedor, se utilizó para diferenciar esta célula del micrófago o pequeño comedor [153]. Posteriormente, se acuñó el término sistema retículo endotelial como una organización multicelular de origen común, compuesta por M Φ y células endoteliales, dirigida a la fagocitosis de partículas en el torrente

sanguíneo. Finalmente, Van Furth y colaboradores introdujeron el concepto de sistema mononuclear fagocítico (SMF) definido como una familia de células derivada de progenitores de la médula ósea que se diferencian a monocitos cuando circulan en la sangre y se convierten en MΦ residentes cuando asientan en un tejido [84,85,192].

3.1. EL sistema monocito/macrófago en la AR y en la OA

Los monocitos son leucocitos circulantes en sangre periférica que actúan como reservorio de precursores para la renovación de MΦ y células dendríticas presentadoras de antígeno que residen en los tejidos. Presentan numerosos receptores depuradores de superficie que reconocen a una gran variedad de microorganismos, así como lípidos y detritus celulares [10]. Existen tres poblaciones distintas definidas según la expresión de dos receptores: el CD14, un componente del receptor para lipopolisacárido (LPS) junto con el receptor tipo Toll 4 y la proteína de unión a LPS; y el CD16, también conocido como receptor para la fracción constante de la inmunoglobulina (Ig) G o FcγRIII [63]. De esta manera, los monocitos se han clasificado en tres categorías: los clásicos o CD14⁺⁺CD16⁻, los intermedios o CD14⁺⁺CD16⁺ y los no clásicos o CD14⁺CD16⁺⁺. El signo más (+) indica una expresión 10 veces superior al isotipo control y el signo (++), un aumento de 100 veces [206]. En un ambiente pro-inflamatorio, pueden producir especies reactivas de oxígeno (ROS) y mediadores inflamatorios como TNF-α e IL-1β, además de tener una gran capacidad de absorción de lipoproteínas oxidadas de baja densidad (oxLDL) [79]. Como hemos comentado previamente, hay una gran cantidad de MΦ en la sinovitis reumatoide, en parte debido a la proliferación de los precursores locales que dan lugar a los MΦ residentes tanto en la íntima como en la subsinovial, y en mayor cuantía de la diferenciación de monocitos infiltrantes provenientes de la circulación sanguínea. Los monocitos CD14⁺CD16⁺ están incrementados en la AR, presentando una expresión significativamente mayor del receptor para quimiocina (CCR)-1, CCR-5 y moléculas de adhesión intercelulares (ICAM)-1 en comparación con monocitos CD16 negativos [93].

En la AR, el sistema monocito/macrófago adquiere distintas funciones, como son la eliminación de inmunocomplejos, la producción de componentes del

complemento, la fagocitosis y el procesado de antígenos para su posterior presentación, la atracción de otros tipos de células inflamatorias, la inducción de neovascularización y la absorción de oxLDL [95]. Los MΦ adquieren un fenotipo activado dentro de la articulación inflamada y juegan un papel esencial en la patogenia de la AR. Los signos de activación se justifican por la sobreexpresión de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-15, IL-18, TGF- β) y anti-inflamatorias (IL-4, IL-10, IL-11, IL-13), quimiocinas (proteína quimioatrayente de monocitos (MCP)-1 y CCR-13) y metaloproteinasas (MMP-9, MMP-12) [9,17,94,95,130]. Por tanto, es razonable pensar que los MΦ puedan atraer células pro-inflamatorias a los focos de inflamación, produciendo moléculas con propiedades destructivas y tóxicas. De hecho, el número de MΦ en biopsias sinoviales se correlaciona con el grado radiográfico de destrucción articular [140].

En la OA, no se conoce bien cuál es la función del MΦ en la sinovial inflamada. Estudios histológicos han demostrado que esta estirpe celular expresa citocinas pro-inflamatorias, VEGF y otros mediadores. En este sentido, los MΦ podrían intervenir también en la expansión angiogénica de la sinovial OA a través de una considerable producción de VEGF [78]. Asimismo, se ha sugerido la implicación de los MΦ sinoviales en otros procesos patológicos en la OA experimental, como es la formación de osteofitos. La liberación de factores de crecimiento, fundamentalmente TGF- β , pero también BMP-2 y BMP-4 en menor medida, y el efecto sinérgico añadido por las citocinas pro-inflamatorias, factores todos ellos producidos por MΦ, parecen ser los elementos clave en el desarrollo de los osteofitos articulares [20–22]. El aumento de la capa íntima y su elevado contenido en MΦ en la OA podría explicarse en parte por la presencia de una gran multitud de cuerpos extraños en el líquido sinovial procedentes de la degeneración del cartílago. Con el fin de eliminar los detritus vertidos al líquido sinovial, se produce una respuesta de la íntima caracterizada por una marcada hiperplasia sinovial.

3.2. Tipos de Células Multinucleadas Gigantes

La fagocitosis es la función principal de los MΦ, no solo dirigida a eliminar cuerpos foráneos sino también a destruir detritos y partículas generados durante el remodelado tisular, en situaciones fisiológicas, y más intensamente en situaciones patológicas. Las células inflamatorias gigantes se forman en respuesta a una digestión incompleta de estas partículas, y por tanto representan una especialización que mejoraría su función [193]. En esencia, la última posibilidad con que cuenta el organismo para eliminar estos desechos. Desde la primera descripción de las células gigantes sinoviales en AR por Grimley y Sokoloff en 1966 [69], algunos autores han descrito su presencia en otras enfermedades reumáticas, como la artritis tuberculosa, la artritis traumática, la sinovitis villonodular, la espondilitis anquilosante, la artritis psoriásica y la OA [19,181]. Las células multinucleadas gigantes (MGC) pueden clasificarse en distintas variantes morfológicas de acuerdo con la ordenación y composición de sus orgánulos. Las células gigantes de cuerpo extraño (FBGC) contienen numerosos núcleos distribuidos de manera difusa en su citoplasma [29]. De manera contraria, las células gigantes Langhans (LGC) presentan sus múltiples núcleos ordenados en forma de herradura de caballo [62]. Las células gigantes Touton (TGC) se caracterizan por sus numerosos núcleos agrupados y rodeados por un citoplasma de aspecto espumoso [7]. Las células multinucleadas plasmáticas (PGC) pueden identificarse por su núcleo excéntrico con una distribución densa de la cromatina [148]. Los osteoclastos son morfológicamente similares a las células gigantes de cuerpo extraño, aunque presentan considerablemente menos núcleos [156]. Los osteoclastos se forman por la fusión de monocitos y desempeñan una función exclusiva en la resorción ósea [97], aunque también pueden originarse de la fusión de otras células multinucleadas y dividirse por estrangulamiento *in vitro* [89]. Como describe Chambers, 2010, los osteoclastos no deben considerarse realmente células óseas sino células inmigrantes de origen sanguíneo, con capacidad fagocítica y con habilidad de adhesión [36]. Así como la formación de células gigantes se produce por la respuesta de MΦ ante la presencia de cuerpos extraños o difícilmente digeribles,

podemos imaginar que los osteoclastos podrían ser células gigantes que se formaran en presencia de componentes estructurales óseos.

3.3. Células Multinucleadas Gigantes en membrana sinovial AR y OA

La presencia de MGC en la sinovitis reumatoide es un hecho infrecuente según la mayoría de autores que han tratado este tema, y solo en una publicación se describe una presencia mayoritaria de estas células [200]. En general, su formación se explica como una respuesta celular que intenta eliminar los detritus tisulares como pueden ser los fragmentos o espículas óseas y de cartílago hialino. Pese a que las MGC se encuentran en un estado de hiperactividad fagocítica, tienen una respuesta pro-inflamatoria reducida, al menos en lo que se refiere a la producción de ROS, así como una expresión disminuida de los receptores de la fracción constante de la Ig [198,199]. Sin embargo, se desconoce en qué medida son capaces de producir otros mediadores inflamatorios como citocinas o eicosanoides. Por otro lado, estas células gigantes también aparecen en la proximidad de superficies óseas. Como hemos comentado previamente, estas células son las responsables de las erosiones óseas en la AR [65,166], siendo partícipes clave en el proceso del remodelado óseo [44]. Tanto en la AR como en la OA, se han observado MGC reabsorbiendo cartílago mineralizado. Estas células, llamadas condroclastos, también expresan estos marcadores de resorción de matriz mineralizada [98].

Las MGC en la OA aparecen como respuesta a la presencia de fragmentos osteocartilaginosos provenientes del cartílago lesionado que son absorbidos por la sinovial. Al igual que en la AR, las MGC de la sinovial OA expresan CD68, y en menor medida TGF- α [6]. Hay cierta controversia sobre la existencia de las MGC en la sinovial OA puesto que en algunos estudios se detecta una presencia mínima o nula [19,152] mientras que otros autores detectan una frecuencia más notable [99,199]. Estas células también expresan TRAP y catepsina K, pero más débilmente que en la AR [49,83], quizás para degradar esos fragmentos óseos englobados por la sinovial o quizás para facilitar el movimiento de células mononucleares a través de la matriz intersticial [86].

3.4. Comunicación condrocito-células del SMF: el cartílago inflamado en el remodelado subcondral

En la relación entre hueso y cartílago intervienen no solo fuerzas mecánicas sino que participan también fenómenos biológicos, de tal manera que la OA es considerada por algunos autores el prototipo de enfermedad biomecánica. El sustrato biológico entre estos dos tejidos está basado en la existencia de interacciones moleculares. El cartílago es un tejido avascular, alinfático y aneural por lo que su metabolismo depende de la difusión de moléculas desde el líquido sinovial y del hueso subcondral. El contenido en proteoglicanos con una alta carga aniónica proporciona a la matriz del cartílago propiedades osmóticas que facilitan la resistencia a la carga mecánica, pero también determina la entrada de moléculas a su interior. La carga negativa de la matriz permite que pequeñas moléculas neutras y catiónicas penetren libremente, mientras que las aniónicas son parcialmente rechazadas. La disponibilidad de nutrientes queda entonces limitada por la permeabilidad de la matriz de acuerdo con el tamaño y carga de las moléculas [194]. Sabiendo que la difusión de moléculas grandes a través de la matriz queda un poco restringida, parece admisible que el hueso subcondral se presente como la fuente de nutrientes de las capas más profundas. Varios estudios describen la permeabilidad del cartílago y la existencia de canales que permiten una intercomunicación a nivel de la región osteocondral entre el cartílago y el hueso subcondral. La aparente forma helicoidal de las prolongaciones del cartílago no mineralizado en contacto con el hueso subcondral sugiere una posible vía de difusión molecular que permite el tráfico de las moléculas entre ambos tejidos, así como la transferencia de fuerzas físicas [58,119,122–124]. Nuestro grupo ha sido el primero en describir que los condrocitos artrósicos humanos producen RANKL y éste difunde hacia el hueso subcondral [139]. El RANKL está implicado en la osteoclastogénesis, en la migración del osteoclasto, en su adherencia al hueso y en su regulación y apoptosis una vez unido a su receptor RANK, que se expresa en las células precursoras, así como en osteoclastos maduros. Se han descrito 3 isoformas distintas del RANKL que pueden encontrarse unidas a membrana o en forma soluble [87]. Las acciones pro-osteoclastogénicas del RANKL se regulan fisiológicamente por los niveles

de OPG, un receptor soluble para la no señalización del RANKL que inhibe de forma competitiva la unión del RANKL a su receptor RANK. Las células del linaje osteoblástico, las células T y los condrocitos producen RANKL en la articulación no inflamada [82,91,100,164], mientras que los fibroblastos sinoviales, las células T y B, los MΦ activados y los condrocitos también lo expresan en la articulación inflamada [66,76,101,113,161]. Diversas citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-17), así como M-CSF, la hormona paratiroidea y la PGE2 incrementan la síntesis del RANKL [28]. Sin embargo, existen otros factores que lo disminuyen, como por ejemplo, IL-4, IL-13 y IL-10, entre otros [205]. Por lo que el remodelado del hueso se determina por un equilibrio entre estos factores y su correspondiente efecto final en la relación RANKL / OPG. El intenso proceso inflamatorio de la AR se considera un factor de riesgo para la destrucción progresiva del cartílago articular y del hueso como se ha comentado anteriormente. Se han descrito 3 formas de pérdida ósea, las erosiones óseas focales, la pérdida ósea yuxta-articular y la pérdida de hueso sistémica [61]. De ellas, la yuxta-articular representa una característica común de la AR que afecta al hueso trabecular adyacente a la articulación inflamada cuya patogénesis no es bien conocida, aunque la pérdida de hueso periarticular está claramente asociada a un desequilibrio del remodelado óseo dónde predomina la resorción frente a la formación. En la sinovitis reumatoide la expresión del RANKL se encuentra elevada. Este mediador es producido por diversas estirpes celulares, predominantemente por células sinoviales B y linfocitos T y B, constituyendo la base biológica de la osteoclastogénesis en esta enfermedad con la subsiguiente producción de las erosiones óseas y fuerte implicación en la pérdida ósea yuxta-articular [167]. Por lo tanto, las concentraciones locales de RANKL podrían conducir a un incremento de la osteoclastogénesis en la interfaz hueso-pannus. Sin embargo, no se ha prestado suficiente atención al posible potencial del RANKL expresado por los condrocitos del cartílago articular y su participación en la pérdida ósea yuxta-articular en la patogénesis de la AR. Es probable que el RANKL producido por los condrocitos articulares contribuyera a las erosiones óseas yuxta-articulares.

3.5. Incremento del remodelado subcondral por osteoclastogénesis y su efecto sobre el deterioro progresivo del cartílago en la OA

El hueso subcondral juega un papel fundamental en la patogénesis de la OA, considerándose una posible diana para su tratamiento [35,137]. Mientras clásicamente se ha considerado que la esclerosis del hueso subcondral siempre está presente en las etapas tardías de la OA, varios autores han sugerido que en las fases tempranas de la enfermedad se produce una resorción ósea [131]. Además, el remodelado de este hueso subcondral podría contribuir de una forma decisiva a la progresión del daño en el cartílago. Estudios clínicos sugieren una posible relación entre marcadores de remodelado óseo y la tasa de pérdida de cartílago en pacientes con OA de rodilla [18]. Los mediadores inflamatorios liberados desde el cartílago podrían contribuir a un incremento del remodelado en el hueso subcondral. En cualquier caso, sigue existiendo controversia acerca de las alteraciones del hueso subcondral, sobre si éstas preceden al daño del cartílago o aparecen más tarde durante la evolución de la enfermedad [160]. Diversos métodos de medida han demostrado que en la OA se produce un incremento del remodelado del hueso subcondral. Mansell y Bailey, 1998, demostraron que la OA se asociaba con un incremento del contenido en colágeno indicando un aumento de la formación ósea, viéndose disminuido significativamente el ratio calcio/colágeno [128]. Pero, por otro lado, a pesar de producirse un mayor volumen del hueso subcondral, éste se encuentra hipomineralizado lo cual da lugar a una disminución de su rigidez, con el consecuente efecto en la biomecánica articular [111]. Independientemente de la comunicación existente entre el hueso subcondral y el cartílago articular y de la influencia del remodelado subcondral, la osteoporosis también está implicada en la patogenia de la OA. En modelos experimentales de OA, estos cambios en el remodelado del hueso subcondral se reflejan a nivel molecular por la disminución de fosfatasa alcalina y por el incremento de la MMP-9 [8]. Diversos autores han establecido una relación directa entre ambas enfermedades, lo que ha dado pie a mostrar cómo una osteoporosis previa agravaba lesiones del cartílago en un modelo experimental de OA en conejos [15,30]. Las etapas tardías de la OA implican 4 procesos fundamentales: la disminución del reemplazo óseo, la esclerosis subcondral,

el engrosamiento de la capa del cartílago calcificado y el adelgazamiento de las trabéculas óseas. En este estadio, se produce una disminución de la resorción ósea sin verse reducida la formación del hueso, observándose un aumento en los niveles de osteocalcina cuando normalmente con la edad se ven más bien reducidos [106]. Todo apunta a que el remodelado subcondral en la OA es bifásico y temporalmente variable. En este sentido, resulta crucial conocer la relación entre el remodelado del hueso subcondral y su fenotipo óseo, osteoporótico o esclerótico.

4. El colesterol como factor estimulante de la actividad del SMF en enfermedades inflamatorias crónicas

La AR y otras enfermedades inflamatorias crónicas se asocian con un incremento de la prevalencia de eventos cardiovasculares de origen arteriosclerótico. Pese a que factores de riesgo tradicionales como la edad, el tabaquismo, la hipertensión o la dislipidemia están implicados en la fisiopatología de la arteriosclerosis (AT), éstos no parecen explicar por completo el incremento de riesgo cardiovascular en pacientes afectados de enfermedades reumáticas [165,174]. Varios datos epidemiológicos sugieren que la AR es un factor de riesgo *per se*, independiente para la progresión de la enfermedad cardiovascular. Sin duda, el incremento de complicaciones cardiovasculares en pacientes con AR está condicionado por el síndrome metabólico (MetS) [54]. Esta entidad se define como un conjunto de condiciones que conlleva un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular y diabetes. Los componentes del MetS son la hipertensión, el incremento de la grasa abdominal, la hiperglucemia, la disminución del colesterol HDL y el aumento de los triglicéridos. Además, el MetS se acompaña de una inflamación sistémica de bajo grado con un efecto deletéreo potenciado por la propia inflamación crónica de la AR. Mediante la disección de los componentes del MetS podríamos entender mejor la contribución que cada uno de ellos aporta a la progresión de la AT, así como a la de la propia artritis. La falta de conocimiento sobre el efecto del colesterol en la progresión de la sinovitis reumatoide resulta de especial interés.

4.1. Las células mononucleares de sangre periférica como transmisores de la inflamación sistémica a los tejidos

Nuestro grupo propuso el primer modelo animal de AT agravada por artritis crónica, que refleja fielmente la aterosclerosis acelerada observada en la clínica humana, en enfermos con AR. En el suero de estos animales se incrementan los mismos mediadores pro-inflamatorios que en la AR, estimulando la síntesis de proteína C reactiva (CRP), el inhibidor del activador del plasminógeno en el hígado, radicales libres y otras moléculas pro-trombóticas. Todo lo cual provoca, también, un estado pro-inflamatorio en las células mononucleares de la sangre periférica. En efecto, se induce la translocación nuclear del NFkB, incrementándose la expresión génica de la ciclooxigenasa-2, MCP-1 y otros mediadores [109,129,163]. Las células así activadas responden más eficientemente a los quimioattractantes producidos en los tejidos diana, facilitando sustancialmente su infiltración en los mismos. De hecho, los monocitos de pacientes con AR son más propensos a adherirse a la pared endotelial de los vasos inflamados [114].

Los monocitos circulantes de sueros hipertriglicérmicos muestran una elevada expresión de CD11c, un receptor de integrinas que regula la VCAM-1, hecho probablemente inducido por la presencia de gotas lipídicas en el citoplasma [5,64]. Igualmente, este marcador está aumentado en monocitos sanguíneos de ratones hipercolesterolémicos [201]. Por tanto, parece que la hiperlipidemia activa a los monocitos circulantes facilitando su migración y, posterior infiltración a la sinovial inflamada.

4.2. Activación del SMF por la hipercolesterolemia

Recientemente, la OA se ha asociado también a un incremento de eventos cardiovasculares. Diversas razones como la inactividad física, la inflamación crónica, la debilidad muscular o el tratamiento con AINES explicarían dicha asociación [157]. [177]. La hipercolesterolemia es un factor de riesgo para la progresión de la OA [4,183], independientemente del factor obesidad [73]. Estudios animales muestran

como la administración de una dieta enriquecida en grasa acelera la progresión de la OA en ratones [138].

Por otra parte, la hiperlipidemia también afecta a la progresión de la AR. Así individuos normo-lipídemicos presentan un menor riesgo de desarrollar AR en comparación con hiperlipidémicos, sin tratamiento con estatinas [90]. El papel de la hipercolesterolemia está bien establecido en la progresión de la AT [47,197]. En nuestro modelo experimental de AT asociado a artritis crónica en conejos, la hipercolesterolemia agrava la inestabilidad de la placa arterioesclerótica y las lesiones aórticas debido principalmente a un infiltrado masivo de MΦ [110]. Se ha descrito en ratas que la hipercolesterolemia inicia y acelera el proceso arteriosclerótico modificando las propiedades funcionales de los MΦ [52]. Como hemos visto anteriormente, los MΦ juegan un papel fundamental en la hiperplasia sinovial y en la producción de mediadores perjudiciales en la artritis inflamatoria. Dada la similitud en los mecanismos fisiopatológicos que ocurren en la AT y en las enfermedades articulares inflamatorias crónicas, se podría conjeturar que la hipercolesterolemia podría contribuir también al daño articular a través de una actividad macrofágica agresiva.

En este sentido, se han empezado a explorar los mecanismos subyacentes a la influencia de la hipercolesterolemia. Durante la hiperlipidemia, los adipocitos liberan gran variedad de adipocinas cuya función resulta relevante en la artritis inflamatoria [23]. Una dieta rica en lípidos ha mostrado contribuir en el cambio fenotípico del MΦ pasando de un estadio anti-inflamatorio a un estadio pro-inflamatorio en ratones obesos asociados a resistencia a insulina [155]. Este cambio induce inflamación sistémica e incrementa potencialmente la progresión de la artritis. Se ha sugerido que la hiperlipidemia también promueve la osteoclastogénesis de células de la médula ósea, *ex vivo*. La presencia de productos resultantes de la oxidación lipídica y el incremento en el tamaño de osteoclastos del hueso indican diferencias funcionales, pero no numéricas, en ratones hiperlipidémicos [189]. Además, una dieta rica en colesterol administrada a ratones se asocia con una disminución en la calidad ósea similar a la de un hueso osteoporótico humano [147].

II. Objetivos

Los MΦ desempeñan múltiples funciones en la sinovitis reumatoide y artrósica. Sin embargo, se desconoce en gran medida otros aspectos relacionados con su diferenciación en la sinovial inflamada y su contribución al propio daño tisular. Por tanto, como primer objetivo nos planteamos:

1. Describir la histopatología de las células del SMF en la sinovitis reumatoide y en la sinoviopatía artrósica humanas así como su relación con la intensidad de la respuesta inflamatoria. Estudiamos los diferentes fenotipos de MGC en la membrana sinovial de individuos con AR y OA, así como su presencia relativa en cada una de estas patologías

Dada la amplia interacción de las células del SMF con las distintas estirpes celulares presentes en la sinovial inflamada nos planteamos estudiar si otras células extra-sinoviales, como los condrocitos articulares, que también participan en la patogenia de ambas artropatías crónicas pudiesen tener relación con el SMF. Para ello, nuestro segundo objetivo consistió en:

2. Determinar si el cartílago articular podría contribuir a la diferenciación de las células mononucleares a osteoclastos, mediante la liberación de RANKL. Estudiamos el ratio RANKL / OPG pro-resortivo producido por los condrocitos articulares, así como la osteoclastogénesis y la pérdida ósea yuxta-articular en un modelo de artritis inflamatoria experimental en conejos.

La hipercolesterolemia empeora algunas de las complicaciones de la AR humana. Uno de los hallazgos relevantes en el estudio de las MGC sinoviales en los pacientes, fue la peculiar asociación de las MGC y la grasa sinovial. Por lo tanto, nuestro siguiente objetivo fue reproducir en un modelo animal estos hallazgos, con el fin de profundizar en los mecanismos de activación de los macrófagos mediados por el componente graso sinovial. Por tanto nuestro tercer objetivo fue:

3. Diseñar un modelo animal de artritis crónica asociado a hipercolesterolemia, en el que poder estudiar la activación del SMF sinovial mediado por la grasa, así como su efecto sobre el daño en la articulación.

III. Materiales y métodos

1. Estudios en humanos

Se realizó un estudio comparativo transversal de muestras sinoviales procedentes de un total de 63 pacientes sometidos a reemplazo total de rodilla y de 21 sujetos *post-mortem* no artríticos que se usaron como grupo control (n=21, PM). Las muestras OA se dividieron en dos grupos, según valoración histológica previamente publicada por Haywood *et al.* [78], que considera como OA no inflamatoria (n=21, OANI) aquellas muestras con ausencia de hiperplasia de la capa íntima (grado 0 y 1) y como OA inflamatoria (n=21, OAI), las muestras con la capa íntima aumentada (grado 3). Por último, se incluyeron muestras sinoviales de 21 pacientes con AR (n=21, RA). Se solicitaron los consentimientos informados a cada donante y a familiares cercanos en el caso de los PM, de acuerdo con los protocolos aprobados por el servicio nacional de investigación ética del Reino Unido, *Nottingham Research Ethics Committee* (05/Q2403/24) y *Derby Research Ethics Committee* (11/H0405/2). Todas las muestras fueron recogidas, fijadas en formalina 10% e incluidas en parafina en el hospital *Sherwood Forest Hospitals NHS Foundation Trust, Sutton in Ashfield*, Reino Unido. El acceso a dichas muestras se realizó en el depósito de tejido articular del servicio académico de reumatología del *Arthritis Research Uk Pain Centre*, ubicado en el *City hospital* de la Universidad de Nottingham.

2. Estudios en animales

2.1. Animales

Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la legislación española vigente (RD1201/2005) y las directrices de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, escritas por los Institutos Nacionales de la Salud (Bethesda, MD, USA). Se emplearon 43 conejos adultos machos, de raza Nueva Zelanda, con un peso comprendido entre los 3 y 3,5 kg, suministrados por la Granja San Bernardo (Navarra, España). Las condiciones ambientales y de temperatura se mantuvieron

constantes a lo largo del estudio, consistiendo en ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Tras dos semanas de aclimatación y manejo en jaulas individuales de 50 x 40 x 40 cm, acceso *ad libitum* a pienso estándar comercial (Panlab®, Barcelona, España) y agua, se separaron aleatoriamente los conejos en 5 grupos y se iniciaron los modelos.

2.2. Modelo de artritis inducida por antígeno (AIA) suplementado con dieta de alto contenido graso

El estudio se inició con 27 conejos, de los cuáles 18 empezaron tomando una dieta de alto contenido en grasa (HFD) compuesta por 1% de colesterol y 3% de aceite de cacahuete (Harlan Inc., Indianapolis, IN, USA). Una semana más tarde, se provocó una artritis inducida por antígeno (AIA) a 9 animales alimentados con HFD (AIA+HFD) [110]. Para inducir la artritis, los conejos se inmunizaron con una inyección intradérmica de ovalbúmina (OVA) (4 mg/ml; Sigma, St. Louis, MO, USA) disuelta en adyuvante completo de Freund (Difco, Detroit, MI, USA), en proporción 1:1, repitiéndose la administración a los quince días. Cinco días después de la segunda inyección intradérmica, se inyectó intraarticularmente 1 ml de OVA (5 mg/ml en 0,9% de NaCl) en la rodilla por semana, durante las cuatro semanas siguientes (Figura 3). Tras la última inyección intraarticular, se dejó evolucionar el modelo 4 semanas más para asegurar un efecto crónico de la inflamación y descartar una reacción directa a las inyecciones. A los 9 conejos restantes que recibieron la dieta HFD no se les provocó la AIA, constituyendo el grupo control (HFD). Otro grupo consistió en 9 conejos que tomaron dieta normal y se les indujo AIA. Dos de ellos murieron por causas desconocidas, siendo el tamaño muestral del grupo a lo largo del estudio $n = 7$ (AIA). A la semana 10, se sacrificaron los animales mediante administración intracardiaca de tiopental sódico 1g/20ml (Tiobarbital Braun, Melsungen, Alemania).

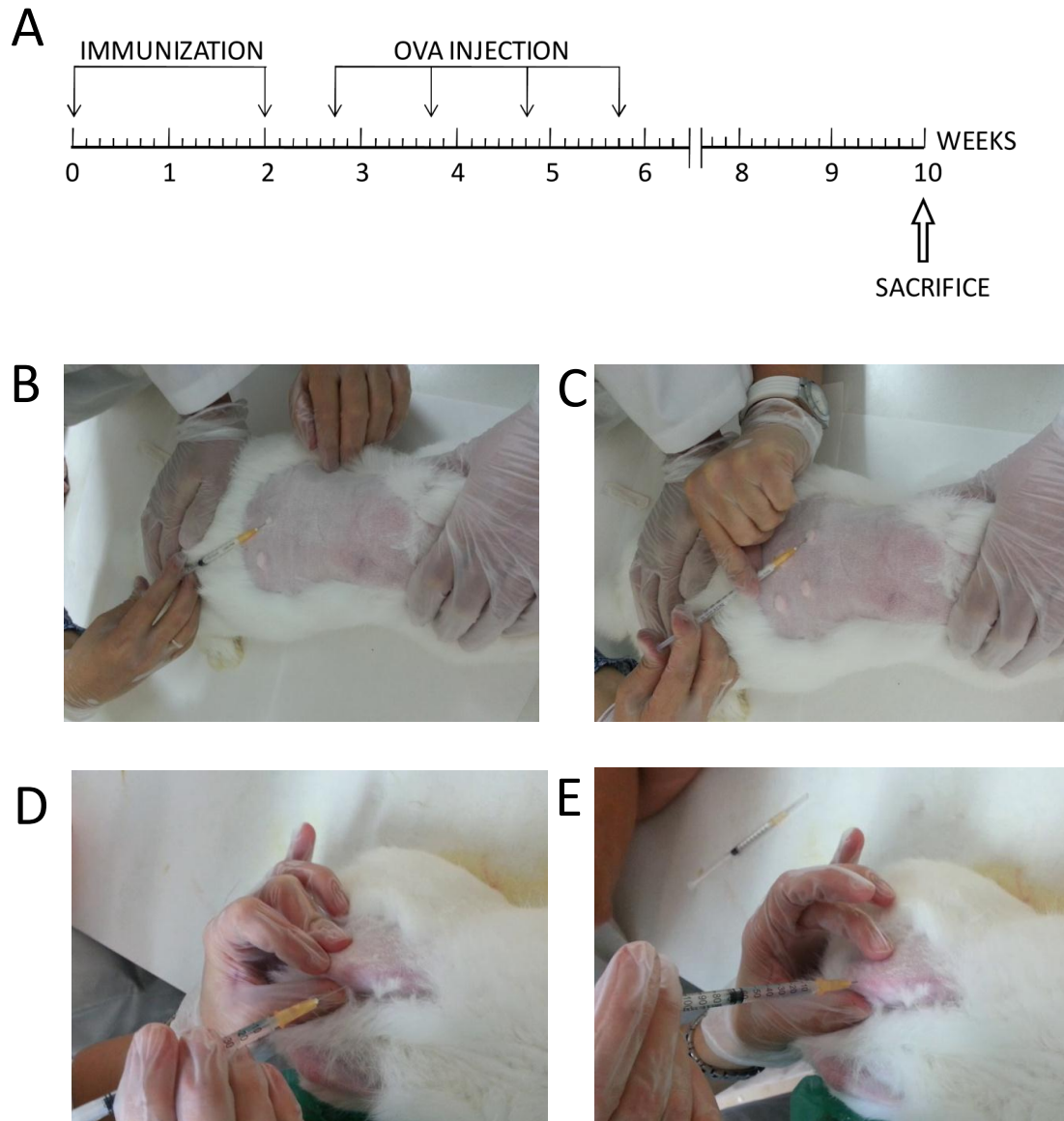


Figura 3. Modelo animal de AIA por inmunización a OVA. A, cronograma del modelo animal. B y C, inyecciones intradérmicas de OVA en distintas regiones de la piel del conejo en su parte dorsal para poder inocular 1 ml completo de OVA disuelto en adyuvante completo de Freund. Se realizan dos veces, una inyección por semana. D y E, localización de la zona interarticular mediante palpación de cóndilos femorales y tibiales con los dedos pulgar y anular. El dedo índice localiza el tendón rotuliano que se atraviesa con la aguja en un plano perpendicular hasta alcanzar la cavidad articular. Se saca ligeramente la aguja para asegurar que la OVA se inyecta en el interior de la cavidad y no se extravasa fuera de ésta. Se realiza una vez por semana, durante 4 semanas.

2.3. Modelo de artrosis

El modelo experimental de OA se realizó mediante una menisectomía parcial medial y sección del ligamento cruzado anterior (ACLT) en 8 conejos (OA). Se trata de un modelo de OA experimental por inestabilidad articular ampliamente utilizado en la literatura [30]. Se practicó la cirugía en condiciones de esterilidad, bajo anestesia general del animal administrando por vía intramuscular hidrocloreuro de xilacina (Ronpum®, Bayer Healthcare + KVP Pharma, Kiel, Alemania) y ketamina (Ketolar®, Pfizer Ireland Pharmaceuticals, Dublin, Irlanda), en proporción 1:2. El día de la intervención y dos días después se administraron por la misma vía cefonicid 1g/2,5ml (cefonicid CombinoPharm, Reig Jofré, Barcelona, España), a modo de profilaxis antibiótica, a razón de 1,5 ml cada día y metamizol magnésico 2g/5ml (Nolotil®, Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Alemania), a razón de 0,3 ml por día. Tras la cirugía, se permitió que los animales se movieran libremente dentro de las jaulas, dejando evolucionar la lesión articular 8 semanas. También se usaron 8 conejos para formar un grupo de conejos sanos (HEALTHY) no sometidos a la lesión articular inducida por cirugía. Dada la amplia experiencia del laboratorio en la inducción de lesión articular mediante ACLT se decidió no incluir un grupo SHAM en el que se realizase incisión del ligamento rotuliano y de la membrana sinovial para comprobar que la inflamación generada por dichas incisiones no afectaba al resultado de la lesión articular. Finalmente, se sacrificaron los animales con tiopental sódico 1g/20ml, por punción intracardiaca.

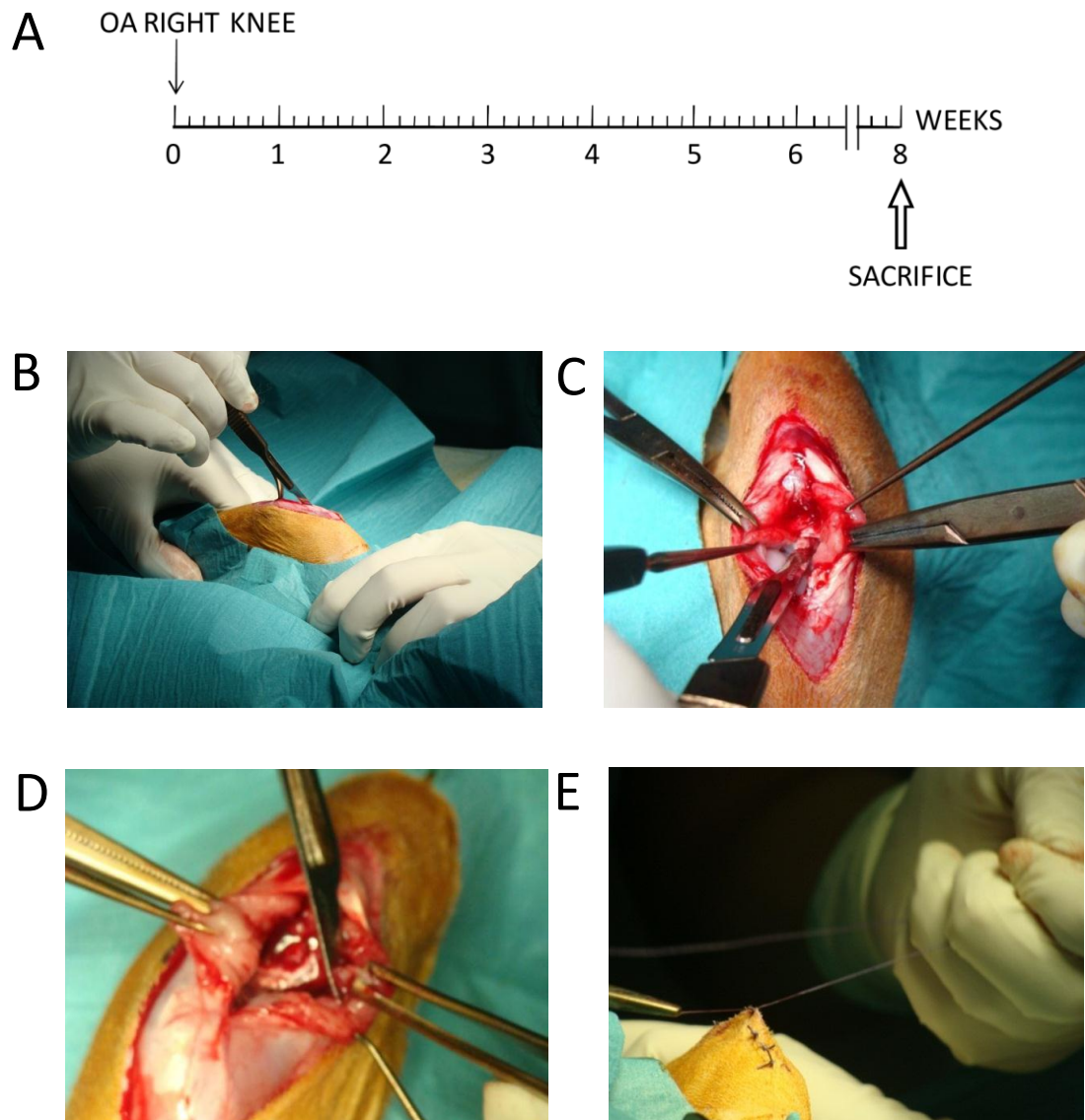


Figura 4. Modelo animal de OA inducido por meniscectomía parcial medial y sección del ligamento cruzado anterior. A, cronograma del modelo animal. B y C, asepsia de la zona quirúrgica e incisión longitudinal del ligamento rotuliano y membrana sinovial para acceder a la cavidad articular. C, sección del ligamento anterior cruzado. D, meniscectomía parcial medial. E, sutura de la cápsula articular y de la piel.

3. Estudios en sangre

3.1. Extracción de suero

Se dejó a los animales en ayunas doce horas antes del sacrificio para sacar 10 ml de sangre de la vena marginal de la oreja. Se usaron tubos con gel separador recubiertos en su interior de silicona y partículas de sílice para acelerar el proceso de coagulación y prevenir la adherencia de hematíes a la pared (BD Vacutainer SST Advance, BD Diagnostics, Plymouth, UK). Una vez centrifugados los tubos, se retiró el sobrenadante (suero) y se recogió una fracción para analizar el perfil lipídico de los conejos. Esta fracción se envió directamente al laboratorio de Bioquímica Clínica de nuestras instalaciones y mediante el Sistema Advia®2400 (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, USA) se analizaron los niveles de colesterol total, lipoproteínas de alta densidad (HDL) y triglicéridos. La fracción restante se usó para analizar proteína C reactiva (CRP) mediante un kit ELISA (Alpha Diagnostic, San Antonio, TX, USA) que determinó cuantitativamente este marcador de inflamación sistémica en el suero de conejo. Los niveles de CRP en los estudios de humanos se determinaron en analíticas previas al reemplazo de rodilla en el hospital *Sherwood Forest Hospitals NHS Foundation Trust, Sutton in Ashfield*, Reino Unido. No se pudo disponer de estos valores para los sujetos PM.

3.2. Extracción de células mononucleares de sangre periférica

Se sacaron 40 ml de sangre en tubos con anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (BD Vacutainer K2E, BD Diagnostics, Plymouth, UK) para aislar células mononucleares de sangre periférica mediante separación celular por gradiente de densidad (Lymphocytes isolation solution, Rafer, Zaragoza, España). Tras su extracción se sembraron 400000 células/pocillo ($1,9 \text{ cm}^2$) y se incubaron a 37°C , 5% CO_2 durante dos horas. Tras ese tiempo, se seleccionaron las células adheridas, activadas al entrar en contacto con la superficie del pocillo, mediante varios lavados

con medio DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium, Lonza Group Ltd., Allendale, NJ, USA), 10% de suero bovino fetal, 1% Penicilina/Estreptomicina, 1% Glutamina, descartando la totalidad de las células flotantes no adheridas. Inmediatamente después las células se fijaron con formaldehído (FA) 4% y se realizó una tinción específica de lípidos con Oil-red-O. Brevemente, se incubaron las células fijadas en isopropanol 60% y se tiñeron con una solución de Oil-red-O en isopropanol en proporción 3:2. Tras la incubación, se realizaron varios lavados con agua destilada y se tomaron fotografías microscópicas. Una pequeña fracción de sangre fue usada para realizar un frotis que se fijó en formaldehído 4% para después teñirse con Oil-red-O.

4. Análisis radiográfico y medida de la densidad mineral ósea

Se realizaron radiografías y se midió la densidad mineral ósea (BMD) de las rodillas de conejo para determinar la osteoporosis yuxta-articular en la semana previa al sacrificio. Un mismo operador de rayos tomó todas las imágenes de rayos x de las rodillas de conejo en posición decúbito supino usando el sistema Philips Diagnost 93 (Philips Medical Systems, Eindhoven, The Netherlands) (Figura 5A y B), a 60kV, 200 mA, 100 ms, en películas de 27,9 x 35,6 cm (Casette Regius RC-110, Konica Minolta, NJ, USA). Las radiografías se realizaron con la pata en extensión completa aplicando un haz de rayos x vertical centrado sobre la articulación femorotibial corregido por un colimador que abarcaba desde la mitad del fémur a la mitad de la tibia [26].

Se determinó la BMD mediante absorciometría de rayos x de doble energía (DXA) de las rodillas izquierdas de los conejos en posición decúbito supino sobre un molde de metacrilato, según protocolo publicado previamente por el laboratorio [33]. Se usó el densitómetro Hologic QDR-1000/WTM de haz concentrado corregido por un colimador de 1 mm de diámetro en la salida del tubo de rayos x (Hologic Inc., Waltham, MA, USA). El densitómetro se calibraba diariamente con el objeto de mantener unas condiciones óptimas de reproducibilidad y calidad en la medida, siempre dentro de los valores recomendados por el fabricante. Las DXA se realizaron con la pata en extensión completa y rotación interna, con el haz enfocado

inmediatamente distal a la interlínea articular (Figura 5C y D). La BMD se midió en cuatro regiones dentro de las epífisis, correspondientes a los dos cóndilos femorales y a ambas mesetas tibiales (0,06 cm² cada una), localizadas respectivamente 1 mm por encima y debajo de la interlínea articular en las zonas de máximo contacto entre los cóndilos femorales y ambos platos tibiales. Los valores medios de la BMD de estas zonas fueron considerados representativos del hueso subcondral subarticular.

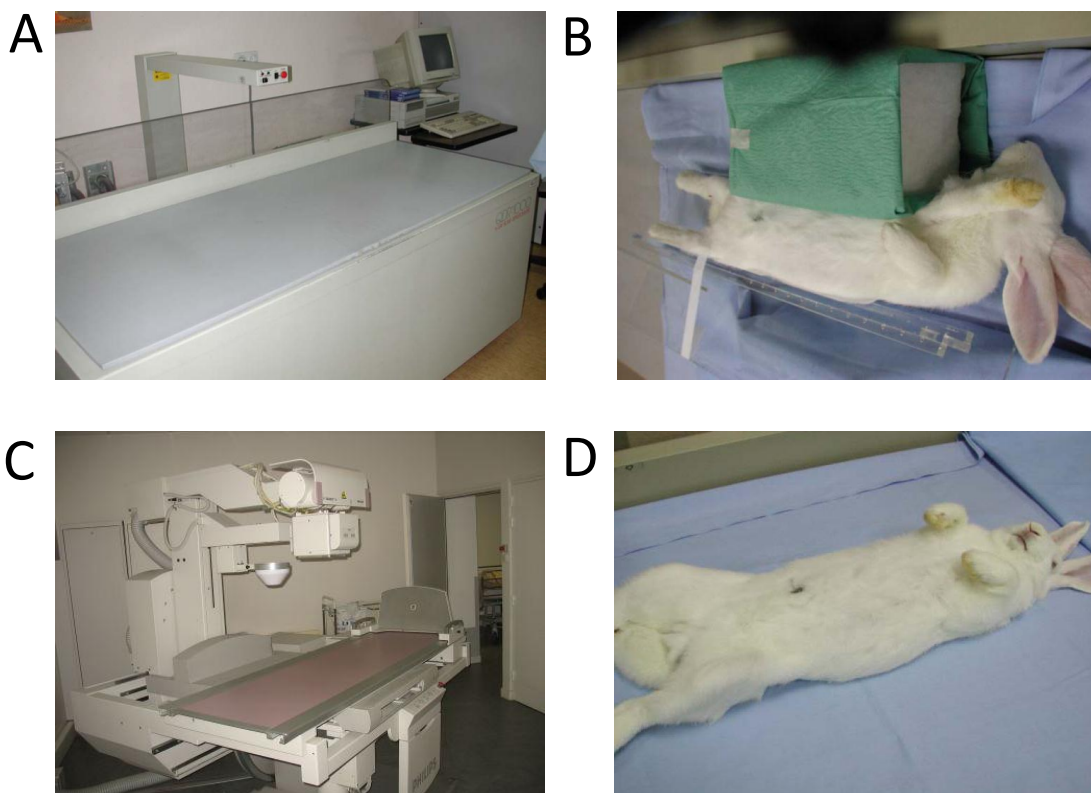


Figura 5. Densitómetro Hologic QDR-1000 y sistema Philips Diagnost93 para densitometría y radiografías (A y C). B y D, posicionamiento decúbito supino de los conejos bajo anestesia general con Ronpum® y Ketolar® en proporción 1:2.

5. Estudios histopatológicos

5.1. Procesamiento de tejidos

Tras el sacrificio, se recogieron las membranas sinoviales de la rodilla derecha de cada conejo para fijar en FA 4%, para ser posteriormente incluidas en parafina en

vista transversal, quedando en un lado la capa íntima o interna a la cavidad articular y en el otro la capa más externa, y cortadas a 5 μm de espesor con un microtomo rotatorio (Microm HM325, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Las sinoviales izquierdas se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido para estudios de biología molecular e histología. Ambos fémures fueron fijados en FA 4% y se descalcificaron durante 4-5 semanas en ácido fórmico 10% y FA 5% para a continuación incluirse en parafina en vista sagital y cortarse a 4 μm . El cartílago articular y el hueso subcondral se obtuvieron de ambas tibias para estudios de expresión génica y proteínas.

En humanos, las membranas sinoviales se fijaron en FA 4%, se incluyeron en parafina y se cortaron a 5 μm . Los fragmentos tibiales se procesaron del mismo modo, quedando cortados en vista coronal al mismo espesor, pero se descalcificaron con una solución de EDTA 10%, polivinilpirrolidona 7,5%, Tris 0,1% y NaOH 0,8% durante un periodo aproximado de un mes. Dicha descalcificación se corroboró por análisis radiográfico con la ayuda del software Faxitron SR v.1.5 (24 kV, 6 s, Faxitron Bioptics LLC, Tucson, USA).

5.2. Valoración de sinovitis por score de Krenn

La inflamación sinovial se evaluó de manera ciega por dos observadores distintos en secciones teñidas con hematoxilina y eosina (H-E), previamente desparafinadas e hidratadas, según la escala de Krenn [104,105]. Se valoró la hiperplasia de la capa íntima, las alteraciones fibrovasculares en el intersticio y el infiltrado inflamatorio del tejido mediante puntuación de 0 a 3, dónde 0 indicaba ausencia, 1 grado leve, 2 intermedio y 3 fuerte. La puntuación total se obtuvo a partir de la suma de los grados parciales con una valoración máxima de 9.

En el modelo animal, además de la valoración del grado de sinovitis, se realizó una tinción Oil-red-O de las membranas sinoviales para estudiar el contenido de células espumosas. Para realizar esta tinción, se usaron pequeños fragmentos de sinovial congelada que se incluyeron previamente en medio de congelación (Jung,

Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, USA) y posteriormente se cortaron con un criostato (Leica CM1900, Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, USA) al doble del espesor usado en parafina.

5.3. Identificación de células multinucleadas gigantes

Las MGC se identificaron en preparaciones de H-E como células gigantes que presentaban 3 o más núcleos en su citoplasma, evitando así confundir aquellas células en mitosis que presentasen 2 núcleos. Las secciones se analizaron a un aumento de 10x y 40x para localizar su posición dentro de la sinovial, bien en la capa íntima o subíntima, y para su identificación morfológica, respectivamente. En humanos, cada MGC fue fotografiada mediante una cámara AxioCam (Carl Zeiss Ltd., North Ryde, NSW, Australia) y su diámetro máximo fue cuantificado en μm mediante el software AxioVision Rel 4.8 (Carl Zeiss Ltd., Welwyn Garden City, UK). Con la misma herramienta se midió el área de las biopsias sinoviales, previamente escaneadas (Epson Expression XL10000, Epson America Inc., Long Beach, CA, USA). El número de MGC se normalizó por el área de las biopsias sinoviales (mm^2).

5.4. Valoración de daño del cartílago articular por score de Mankin

Tras desparafinar e hidratar las secciones de fémur, se tiñeron con Safranina/Fast-Green y con azul Alcian/ácido peryódico de Schiff (PAS) para estudiar del cartílago articular. Las muestras fueron evaluadas por dos observadores de forma ciega mediante una versión modificada de la escala propuesta por Mankin [127] ya usada por otros autores para valorar cartílago artrósico de conejo [190]. Esta versión también analiza la tinción de la matriz (0 a 6), la celularidad (0 a 4), la formación de clonas (0 a 3) y la estructura del cartílago articular (0 a 8). Se omitió la puntuación parcial de la integridad de la línea limitante basófila o *tidemark* por no ser identificada en todos los casos. La puntuación global resultó de la suma de las valoraciones

parciales de cada una de las variables analizadas, siendo la puntuación máxima de 21 puntos.

5.5. Valoración del espesor del hueso subcondral

Se usaron las secciones de fémur teñidas con azul Alcian/PAS para estudiar el grosor del hueso subcondral. Se fotografiaron todas las preparaciones a una misma magnificación, 4x. Se dividió el cóndilo femoral en cinco regiones distintas, siendo las regiones I y V las zonas anterior y posterior dónde convergen hueso y pannus y las regiones II a IV las zonas de carga. Se unió mediante una línea imaginaria el punto de conexión entre hueso y pannus anterior y posterior para delimitar las medidas de espesor de hueso subcondral en los cinco puntos de interés. En esa localización, se trazaron líneas tangenciales que abarcaban la limitante basófila y el final de la placa cortical del hueso subcondral. De esta manera, se midió la distancia entre ambas líneas paralelas para cuantificar el espesor del hueso subcondral (Figura 6A).

5.1. Valoración de pannus invasivo

Se evaluaron secciones de fémur teñidas con H-E para cuantificar el grado de invasión sinovial en su región posterior dónde convergen hueso y pannus. Se cuantificó la extensión de la superficie de contacto midiendo la longitud de la línea limitante entre ambos tejidos, así como el área del tejido de granulación en contacto con hueso con la ayuda del software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). Se tomaron microfotografías de las secciones en el mismo plano para valorar un área similar en cada medida (Figura 6B).

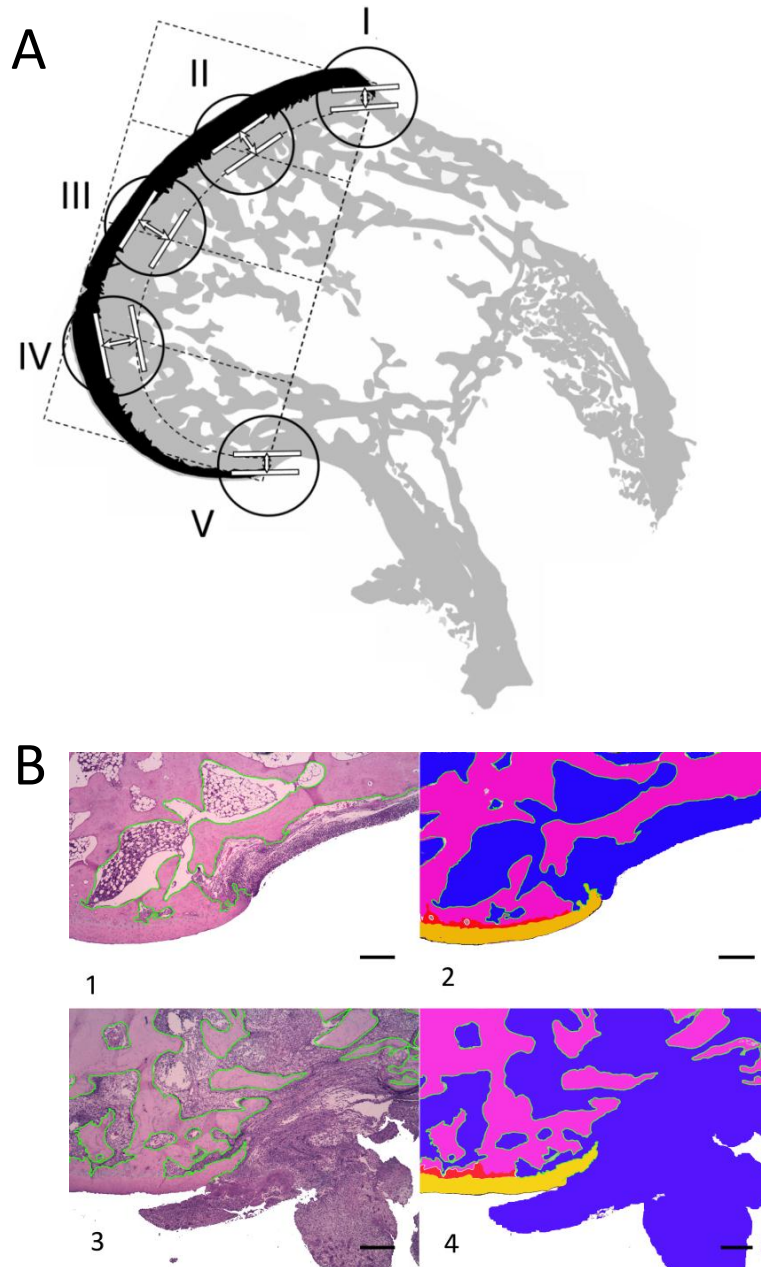


Figura 6. Metodología aplicada para la valoración histológica del espesor del hueso subcondral y del pannus sinovial en cóndilos femorales de conejo. A, representación esquemática de las cinco regiones en las que se midió el espesor del hueso subcondral. B, secciones representativas de cóndilo femoral de conejos AIA (1 y 2) y AIA+HFD (3 y 4) en las que se midió la extensión de superficie de contacto, línea verde (1) y el área del tejido invasivo en azul, hueso en rosa (2) con la ayuda del software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA), tinción H-E, escala = 200 μ m.

6. Inmunohistoquímica y ensayo de actividad enzimática

Se identificaron MΦ en membrana sinovial usando anticuerpos primarios monoclonales anti-RAM11 en conejos (1/100; Dako, Glostrup, Dinamarca) y anti-CD68 en humanos (1/200; Dako, Glostrup, Dinamarca). Se detectaron estos anticuerpos con Ig G biotiniladas anti-ratón producido en cabra (1/100; Amersham, Arlington Heights, IL, USA) y en caballo (1/200; Vector laboratories, CA, USA). Se visualizaron mediante revelado del complejo avidina/biotina unido a enzima peroxidasa (ABC), usando diaminobenzidina (DAB, Dako, Camarillo, CA, USA) como cromógeno y níquel-DAB [175].

En otras secciones de sinovial, se usó como marcador de células endoteliales para determinar vascularización el anticuerpo primario anti-CD31 (1/20; Abcam, Cambridge, UK), detectado con Ig G anti-ratón producido en cabra (1/100; Amersham, Arlington Heights, IL, USA) y visualizado mediante método ABC con DAB. Se escanearon las preparaciones (Coreo Iscan Au scanner, Ventana Medical System, Tucson, AZ, USA) y se cuantificaron las células CD31+ normalizando por el área de sinovial analizada en mm² (Virtuoso Image management software, Ventana Medical System, Tucson, AZ, USA).

Se estudió la resorción ósea activa mediante el análisis de células catepsina K + en secciones de membrana sinovial y de fémur en los modelos animales (1/50; Abcam, Cambridge, UK) y en sinoviales y platos tibiales de humanos (1/100; Abcam, Cambridge, UK). Se cuantificó la tinción positiva en los fémures de conejo, concretamente en la región donde convergen hueso y pannus en el área posterior del cóndilo femoral, usando el dispositivo de obtención de microimágenes digitales Leica DMD108 (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, USA) y el software Image Pro Plus (versión 4.5, Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). En otras secciones de fémur de conejo, se detectó el patrón de distribución de las células que expresaban RANKL (1/25, Santa Cruz Biotech, Heidelberg, Alemania) y OPG (1/100, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) por el mismo método ABC revelado con DAB.

Antes de la incubación con anticuerpos primarios, se desparafinaron y rehidrataron las muestras, se inhibió la peroxidasa endógena con una solución 1:1 de metanol y agua oxigenada 3%, y se aplicaron las siguientes técnicas de recuperación termoinducida del epítipo usando tripsina 0,1% en CaCl_2 0,1% para CD31, RANKL y OPG; citrato sódico 10 mM 0,05% Tween®20 a pH 6 para RAM11 y catepsina K; y pepsina 0,1 % en ácido acético 0,5 M para CD68.

Con el fin de caracterizar las MGC detectadas, se tiñeron las sinoviales humanas con un kit anti-fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP, Sigma, St Louis, MO, USA) según protocolo del fabricante, previa incubación en CaCl_2 1mM y MgCl_2 1mM. Se contabilizaron aquellas células positivas con múltiples núcleos usando el microscopio Axioskop-50 (Carl Zeiss Ltd, Welwyn Garden City, UK).

Los fragmentos tibiales humanos sirvieron para estudiar la osteoclastogénesis mediante medida directa de MGC teñidas positivamente para TRAP y normalizadas por el área de hueso subarticular. Tras su descalcificación en EDTA, se cortaron fragmentos de medio centímetro de ancho en plano coronal de los platos tibiales procedentes de las cirugías de remplazo total de la rodilla. A su vez se dividió el cóndilo medial en 3 partes proporcionales, siendo 3 el más interno, 2 la zona media y 1 el más externo. Se procesaron para su inclusión en parafina y se tiñeron con TRAP, aplicando el mismo método que para las membranas sinoviales. Se calculó el área de hueso con un calibre milimétrico y se contó el número de células TRAP positivas que presentara más de un núcleo en cada una de las tres partes. Finalmente, se hizo la media de las tres partes para obtener un resultado representativo de la totalidad del cóndilo (figura 7).

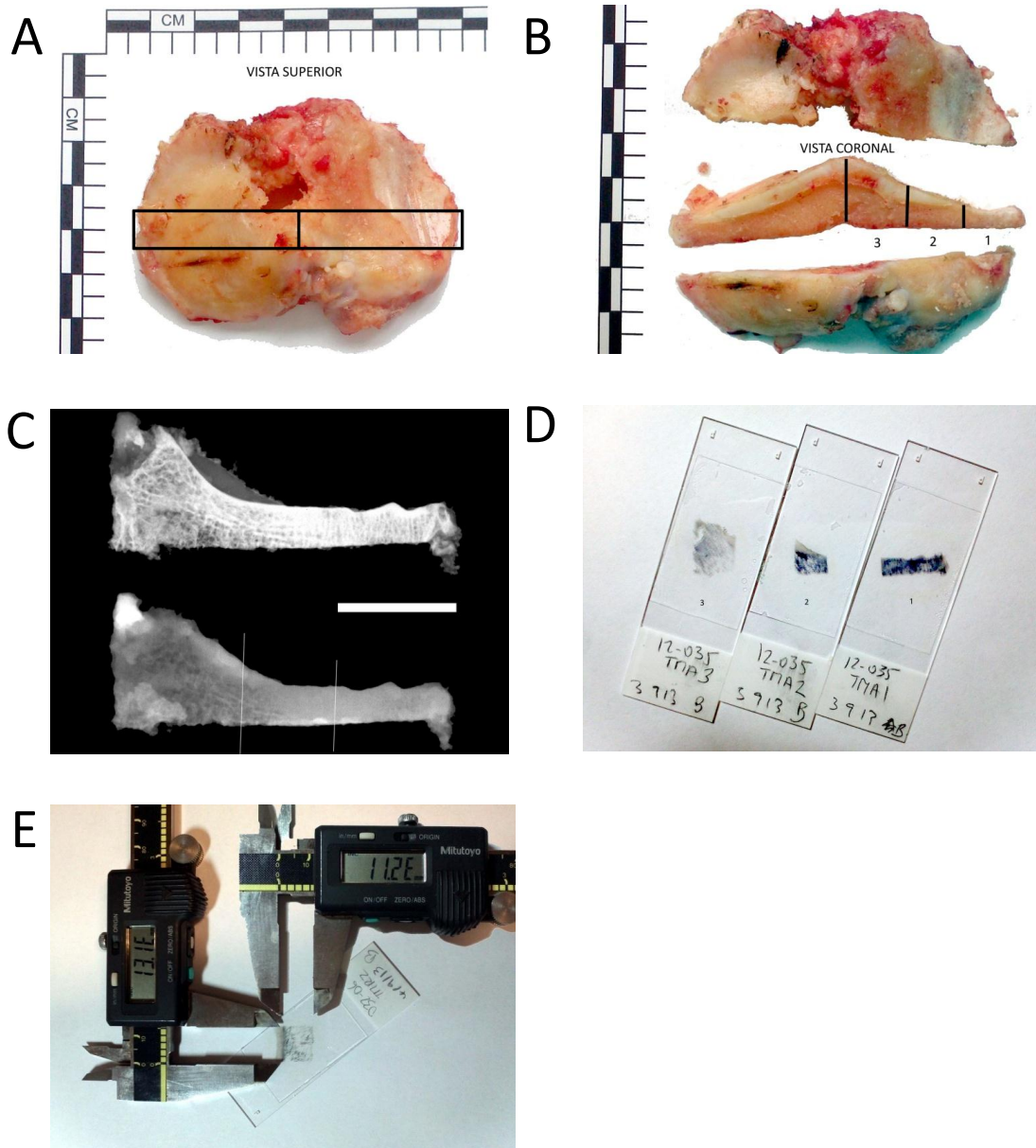


Figura 7. Metodología empleada para la cuantificación de la osteoclastogénesis en el hueso subcondral. A, plato tibial OA humano izquierdo fotografiado en vista superior. B, sección del área delimitada en un plano coronal y división del fragmento en 3 partes. C, confirmación de la correcta descalcificación en EDTA del cóndilo tibial con la ayuda del software radiográfico Faxitron SR (24 kV, 6 s, Faxitron Bioptics, Tuson, USA), escala = 1 cm, la parte inferior muestra el fragmento descalcificado. D, cortes histológicos representativos de las 3 partes analizadas para la cuantificación de TRAP en el fragmento tibial. E, medición del área a analizar con la ayuda de un calibre digital.

7. Estudios de expresión génica

Para los estudios de expresión génica se aisló el RNA de las membranas sinoviales congeladas de los conejos mediante separación líquida de fases (Tripure Isolation reagent, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) y se retrotranscribió 1 µg usando el kit High Capacity cDNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) siguiendo las instrucciones del manual. La expresión de RNA se cuantificó por PCR a tiempo real (StepOnePlus™ detection System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) usando el software StepOne™ versión 2.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los oligonucleótidos específicos marcados con sonda fluorescente en el extremo 5', así como las sondas para TNF-α (Oc 03397715_m1) y para MCP-1 (ensayo personalizado, Applied Biosystems) se compraron a la casa comercial. Se usó como control endógeno una sonda para GAPDH (Oc 03823402_g1) para normalizar la expresión en cada muestra.

8. Estudios de proteínas por Western Blot

Se pulverizaron las muestras congeladas de cartílago articular, hueso subcondral y membrana sinovial de conejo mediante homogeneización mecánica en una cámara enfriada previamente con nitrógeno líquido para extraer proteína total. El homogeneizado se resuspendió en un tampón de lisis frío con HEPES 15 mM, glicerol 10%, Nonidet P-40 0,5%, NaCl 250 mM, EDTA 1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,1M y un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma, St Louis, MO, USA). La concentración de proteína total se midió por el método del ácido bicinonínico (BCA, Pierce™ Protein Assay kit, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) que consiste en la reducción de iones Cu²⁺ a iones Cu⁺ por contacto con proteínas en un medio alcalino. La combinación de BCA con iones Cu⁺ tiene como resultado de la reacción una coloración púrpura que se midió por absorción espectrofotométrica a una longitud de onda de 540 nm. Tras la cuantificación proteica se cargaron y se separaron por electroforesis 20 µg de proteína total en geles de sodio dodecil sulfato y poliacrilamida

al 15%. Se transfirieron las proteínas a una membrana de polivinildenofluoruro (Millipore, Molsheim, Francia) y se bloquearon con albúmina de suero bovino 4% y leche desnatada 3% en buffer fosfato salino con Tween®20 al 0,5% a temperatura ambiente durante una hora. Durante la noche, se incubaron a 4°C las membranas con anticuerpos anti-RANKL (1/1000, Peprotech, Neuilly-Sur-Seine, Francia) y anti-OPG (1/1000, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). La unión del anticuerpo se visualizó utilizando el anticuerpo secundario conjugado correspondiente y el kit de quimioluminiscencia enzimática (ECL, Amersham, Arlington Heights, IL, USA). Las bandas se cuantificaron por densitometría (GS800, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) y los resultados se expresaron como unidades arbitrarias usando el software Quantity One versión 4.6.3 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

9. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se desarrollaron usando el software SPSS versión 17.0 para Windows (IBM, New York, NY, USA). Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (SEM). La comparación entre proporciones se realizó aplicando el test de la Chi cuadrado y las correlaciones se calcularon con el coeficiente rho de Spearman. Se realizaron comparaciones múltiples aplicando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Se hicieron comparaciones por parejas aplicando el test de Mann Whitney, penalizando los valores p obtenidos por el método de Bonferroni, es decir por el número de comparaciones realizadas. Las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de $p < 0,05$.

IV. Resultados

1. Células multinucleadas gigantes de la membrana sinovial de pacientes con AR y con OA

Nuestro primer objetivo consistió en describir las células del SMF en la sinovitis reumatoide y en la sinoviopatía artrósica. Antes de iniciar el estudio, se separaron las muestras OA en dos grupos: inflamatorio y no inflamatorio con el fin de encontrar una asociación de las MGC dependiente de la enfermedad o de la propia inflamación. Tras analizar parámetros clínicos en los distintos grupos del estudio, caracterizamos morfológicamente los diferentes tipos de MGC que identificamos en las sinoviales de individuos AR y OA.

1.1. Demografía y datos clínicos de la población de estudio

Los pacientes seleccionados para los distintos grupos se emparejaron por edad y en algunos casos por sexo. Los niveles del coeficiente de sedimentación globular estaban significativamente incrementado en el grupo AR en comparación con OANI ($P < 0,01$), mientras que los niveles de CRP estaban más aumentados que los de OANI y OAI ($p < 0,01$) (Tabla 1).

Tabla 1. Datos demográficos y clínicos de los pacientes del estudio. Los datos de sedimentación globular (ESR) y proteína C reactiva (CRP) para los pacientes post-mortem (PM) no estaban disponibles. Los datos accesibles para los niveles de ESR fueron $n = 13$ (OANI), $n = 18$ (OAI) y $n = 20$ (AR); y para CRP $n = 12$ (OANI), $n = 18$ (OAI) y $n = 21$ (AR).

	PM	OANI	OAI	RA
N	21	21	21	21
Age, years	68 (39 - 84)	68 (41 - 84)	68 (41 - 85)	68 (40 - 84)
Gender, female, %	43	48	38	50
Serum ESR, mm/hr	Not available	11,38 \pm 3,04	15,17 \pm 1,88	27,8 \pm 4,85*
Serum CRP, mg/L	Not available	6,17 \pm 1,71	7 \pm 1,46	35,42 \pm 11,80*#

* $p < 0,01$ vs. OANI; # $p < 0,01$ vs. OAI

1.2. Células multinucleadas gigantes de la sinovial humana

Se identificaron distintos tipos de MGC en relación a su distribución nuclear en las sinoviales humanas. Se detectaron estas células en la capa íntima y subíntima. Los fenotipos LGC y FBGC se observaron con frecuencia alrededor de depósitos de fibrina o fagocitando hemosiderina y detritus tisulares. Se observaron MGC de tipo osteoclasto en la región de pannus adyacente a superficies óseas. Las MGC de tipo Touton rodeaban adipocitos y las PGC solamente se encontraron próximas a agregados linfocitarios (Figuras 8 A y B).

Se observaron células tipo MΦ en la capa íntima y subíntima que se tiñeron positivamente para CD68. En aproximadamente la mitad de las sinoviales humanas estudiadas, algunos MΦ (CD68 positivos) se identificaron en una disposición concreta, rodeando y envolviendo a los adipocitos. En la sinovial inflamada (AR y OAI) varias de estas células mostraron múltiples núcleos. Otras de las células CD68 positivas mostraron un citoplasma con múltiples vacuolas en su interior, con un aspecto típico de las células espumosas vasculares, que presentan vacuolas lipídicas (Figura 8 C).

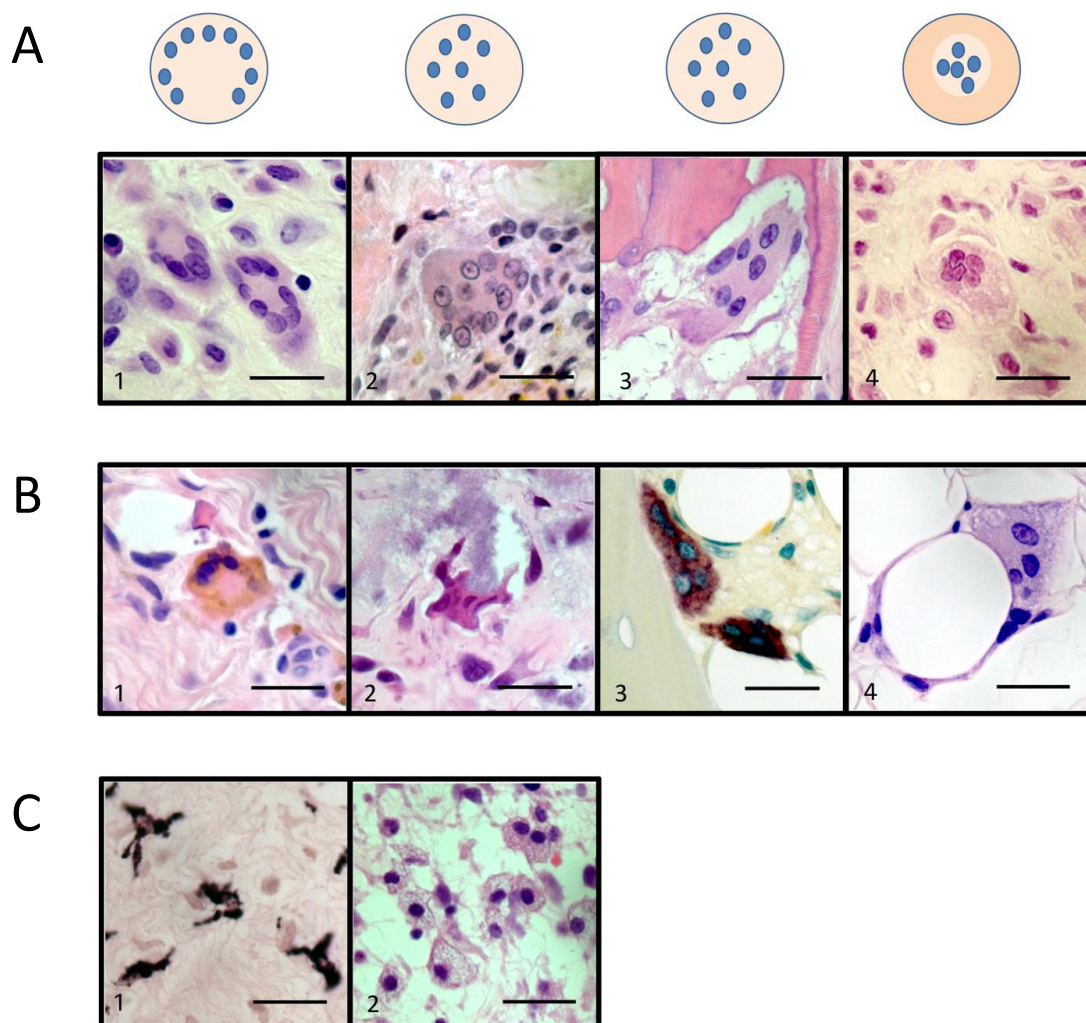


Figura 8. Morfología y afinidad por dianas específicas de las MGC en sinovitis humana. A, identificación morfológica nuclear de las diferentes MGC de tipo Langhans (1), de tipo cuerpo extraño (2), de tipo osteoclasto (3) y de tipo Touton (4) en sinovial inflamada humana, tinción H-E. B, se detectaron MGC asociadas a dianas específicas, como hemosiderina (1), depósitos de fibrina (2), hueso (3, tinción TRAP) y adipocitos (4), en sinovial inflamada de humana. C, se identificaron células mononucleares precursoras de las MGC teñidas positivamente para CD68 (1) así como células espumosas (2) en la sinovial inflamada de humanos. Escala = 20 μ m.

1.3. Caracterización de las MGC sinoviales humanas

Tras describir morfológicamente los distintos tipos de MGC presentes en la membrana sinovial, decidimos estudiar cómo de frecuente era su presencia en los grupos de estudio y qué tipo era más abundante. El porcentaje de pacientes que presentaba MGC en membrana sinovial era significativamente mayor en el grupo AR y OAI en comparación con OANI y PM ($P < 0,05$). Se detectaron más MGC en la sinovial OA inflamada que en la no inflamada ($P = 0,006$). El conteo absoluto de las MGC corregido por su área no fue diferente entre los grupos OAI y AR ($0,27 \pm 0,10$ y $0,54 \pm 0,33$, $P = 0,623$). Sin embargo, se observó una distribución de fenotipos distinta en cada enfermedad. Mientras que en la sinovial OA, los tipos más abundantes fueron las LGC, en la sinovial reumatoide, los fenotipos morfológicos predominantes fueron las LGC y las FBGC. El tipo TGC y PGC se encontraron en proporciones similares en OA y en AR. La medición del diámetro máximo mostró que las MGC de la sinovial AR presentaban un mayor tamaño que las observadas en OA (Figura 9).

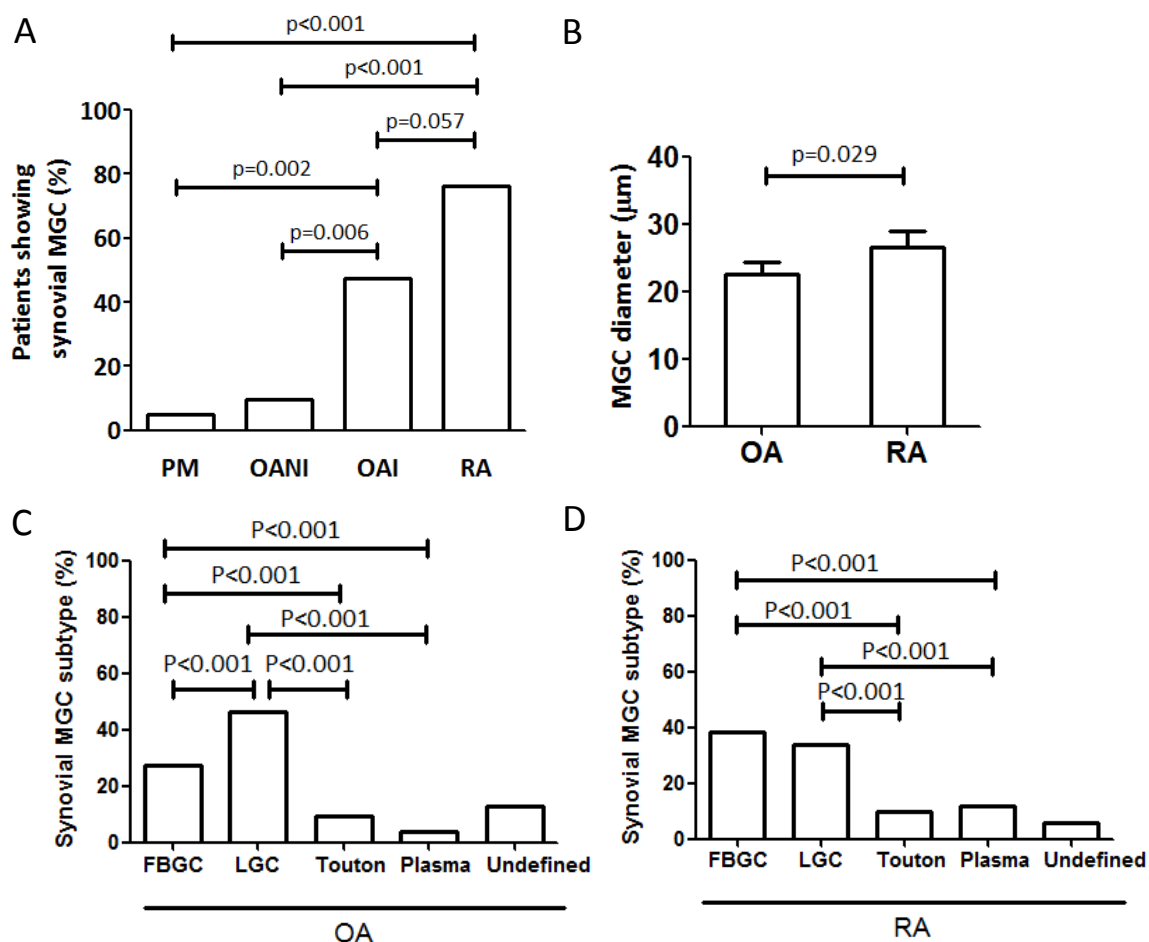


Figura 9. Caracterización de las MGC en membrana sinovial AR y OA. A, Tanto por ciento de pacientes que mostraron MGC en la membrana sinovial, siendo mayor en los grupos OAI y AR que en OANI y PM. B, tamaño en μm de las MGC en la sinovial AR y OA. C y D, tanto por ciento de los distintos subtipos morfológicos predominantes en la sinovial OA y AR.

Una vez analizada la distribución de los distintos tipos de MGC, se analizaron marcadores específicos. En cuanto a la tinción para TRAP, encontramos que varias MGC se tiñeron positivamente, mientras que otras no. Las MGC negativas para TRAP mostraron un fenotipo característico de LGC, TGC y PGC. Sorprendentemente, no observamos células MGC positivas para catepsina K en el tejido sinovial, aunque algunas células mononucleares de la capa íntima si se tiñeron positivamente para este marcador, únicamente en los grupos OAI y AR. Con el fin de asegurar estos resultados, utilizamos cortes histológicos de platos tibiales humanos procedentes de pacientes con AR a modo de control positivo. Como esperábamos, varias células óseas fueron positivas para catepsina K. Además, en estos cortes histológicos, identificamos células MGC catepsina K positivas en el pannus sinovial que se encontró en contacto con la superficie ósea, y únicamente en esta disposición (Figura 10).

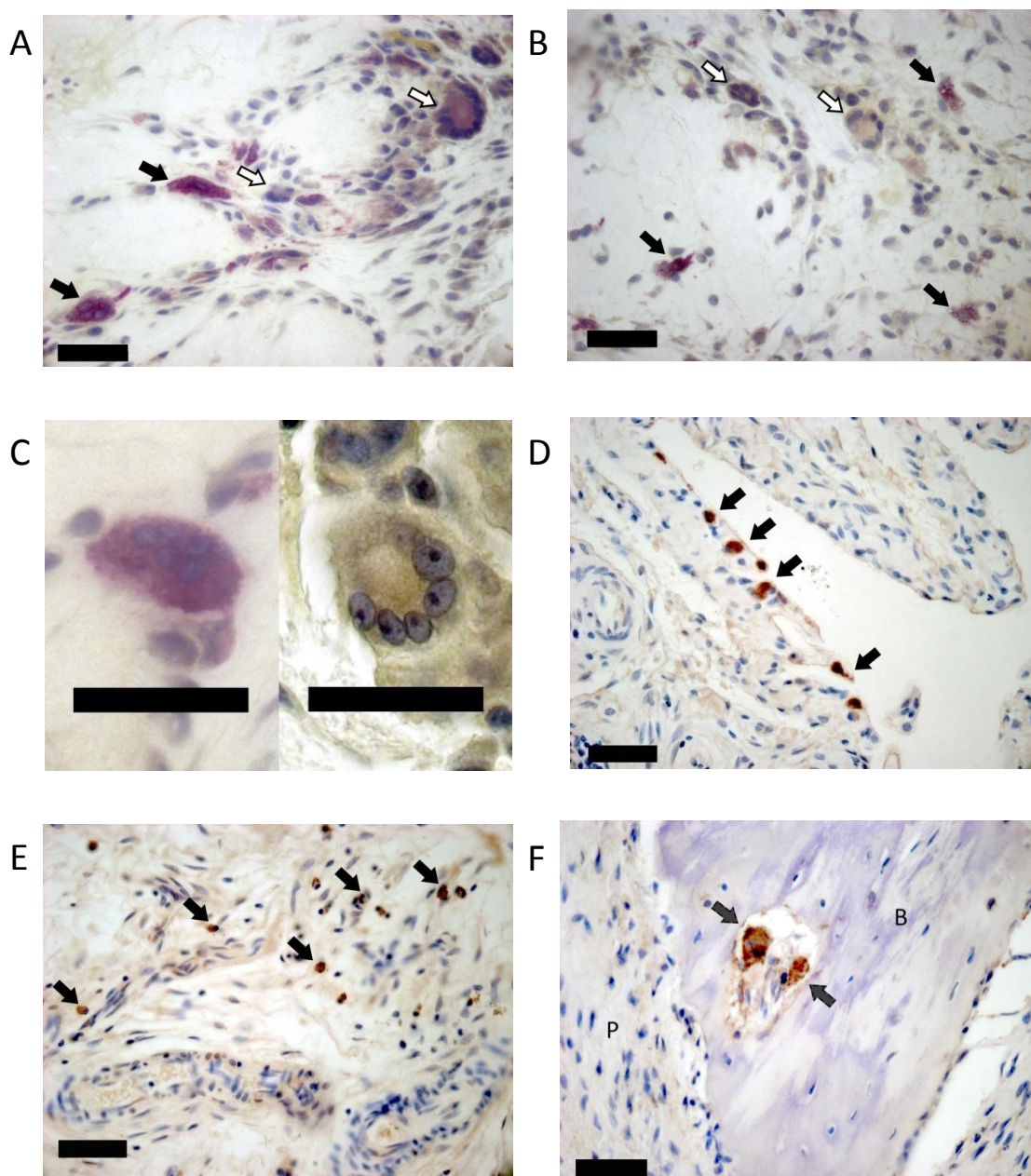


Figura 10. Marcadores específicos para las MGC. A y B, secciones representativas de MGC TRAP positivas y TRAP negativas en sinovial OAI (A) y AR (B), escala = 20 μ m. C, detalle de la tinción TRAP positiva y negativa en relación al tipo morfológico de MGC. D y E, secciones sinoviales representativas de células catepsina K positivas en OAI (D) y AR (E), escala = 20 μ m. F, control positivo para catepsina K inmunoreactiva en MGC de plato tibial de paciente con AR (B = hueso y P = pannus).

1.4. Inflamación sinovial y densidad de las MGC

A continuación, comprobamos si existía alguna relación entre la presencia de MGC en la membrana sinovial y el grado de inflamación tisular. Para ello, realizamos un estudio histopatológico de las membranas sinoviales, aplicando la escala de Krenn descrita en métodos. Las sinoviales AR y OAI se caracterizaron por una marcada hiperplasia de la íntima, una importante fibrosis de la capa subíntima y vascularización del estroma, y ocasionalmente infiltrados inflamatorios que contenían agregados linfoides. Las sinoviales OAI y AR mostraron una puntuación global de sinovitis significativamente mayor que OANI y PM ($P = 0,006$). El grado de sinovitis y la densidad de MGC en la sinovial se asociaron positivamente en AR y en OA (Figura 11). Además, la densidad de MGC fue mayor en las sinoviales que presentaban más celularidad en el estroma en AR ($r = 0,53$; $P = 0,03$) y mayor grado de infiltrado inflamatorio en OA ($r = 0,63$; $P = 0,03$). Las correlaciones realizadas entre los niveles de CRP y la densidad de MGC en AR y en OA no alcanzaron significación estadística, por lo que no se pudo establecer asociación entre ambas variables ($r = 0,09$; $P = 0,75$ y $r = 0,30$; $P = 0,38$, respectivamente). De igual modo, los niveles de ESR no se correlacionaron con la densidad de MGC en AR y en OA ($r = -0,17$; $P = 0,68$ y $r = -0,20$; $P = 0,55$).

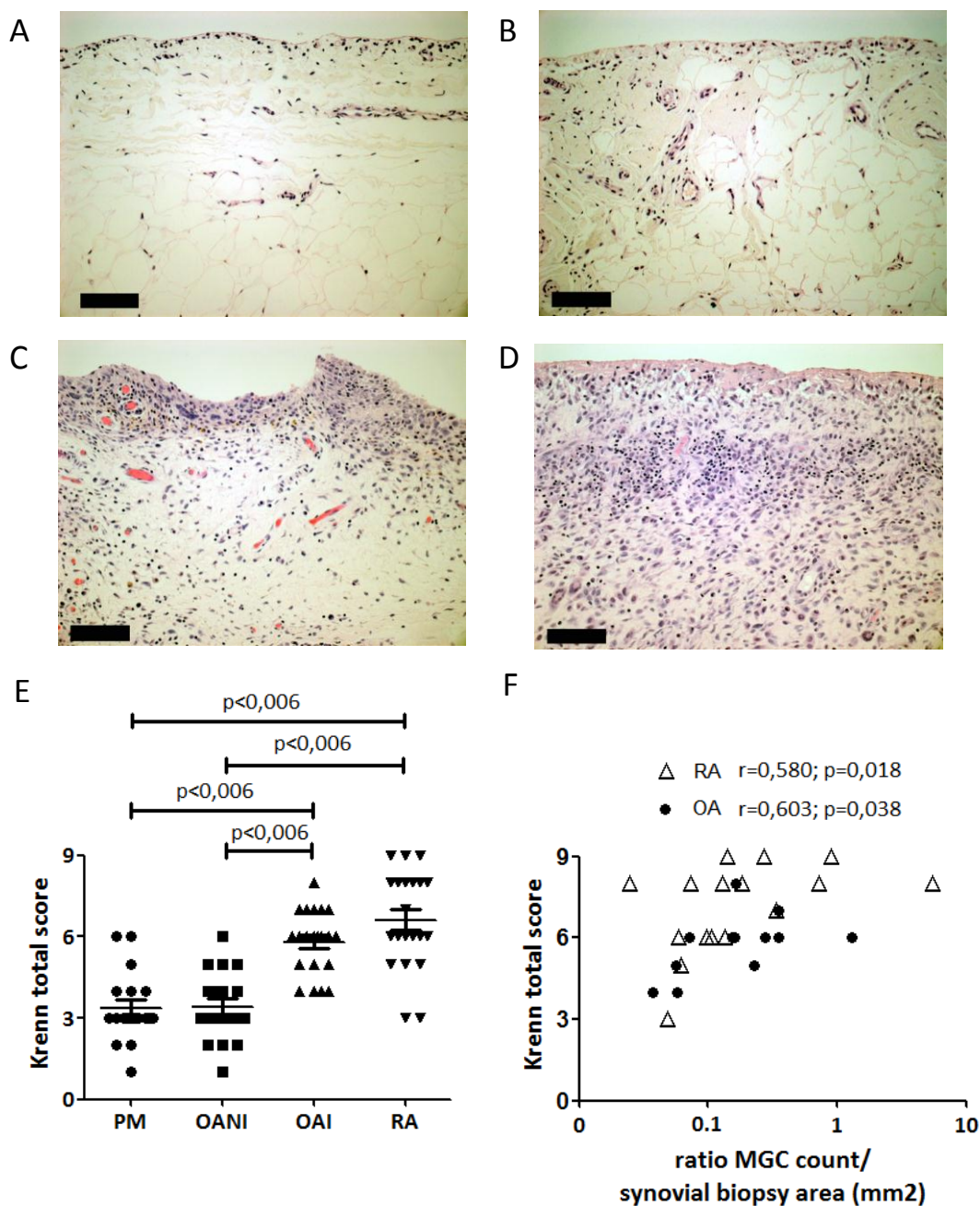


Figura 11. Histopatología de la membrana sinovial humana AR y OA. secciones representativas de la membranas sinoviales teñidas con H-E de los grupos PM (A), OANI (B), OAI (C) y AR (D), escala = 100 μ m. E, puntuación global determinada por el score de Krenn de la sinovitis, descrito en métodos. F, correlación entre el score de Krenn total y la densidad de MGC normalizado por su área (mm²) en AR y OA.

2. El RANKL sintetizado por los condrocitos articulares contribuye a la pérdida de hueso yuxta-articular en la artritis crónica

Tras observar la aparente afinidad de algunos tipos de MGC por el hueso y su implicación en el remodelado óseo subcondral en el estudio de humanos, así como la amplia interacción que mantienen con las diferentes estirpes celulares presentes en la sinovial inflamada, nos planteamos conocer si la comunicación entre las células del SMF y los condrocitos articulares tendría algún efecto sobre la pérdida ósea yuxta-articular en un modelo animal experimental de artritis crónica.

2.1. Pérdida ósea yuxta-articular

Comenzamos esta parte del estudio realizando un estudio radiográfico y midiendo la BMD en las rodillas de conejos del modelo animal para confirmar que efectivamente nuestra inducción experimental de artritis producía una pérdida de hueso yuxta-articular como la que acontece en la AR.

El análisis radiográfico de los conejos AIA mostró una pérdida ósea yuxta-articular y un estrechamiento simétrico del espacio articular de las rodillas afectadas. La correcta extensión de las patas en los dos grupos AIA resultó dificultosa por el elevado grado de inflamación que impedía la postura anatómica deseada de la articulación. Solamente en los conejos AIA+HFD, la extensión máxima apenas alcanzaba los 110 grados, no pudiéndose comparar con el resto de grupos. Las radiografías de los conejos OA mostraban un estrechamiento medial del espacio articular mientras que los conejos sanos y los HFD mostraban un aspecto del espacio articular normal (Figura 12A).

Las bajas densidades observadas en las radiografías se confirmaron con el análisis densitométrico del hueso subcondral. Las rodillas de conejos AIA mostraron una BMD significativamente más baja que las de los conejos sanos ($0,27 \pm 0,02$ frente a $0,55 \pm 0,02$, $P = 0,029$). Los valores de BMD para los conejos HFD y OA también eran más bajos en comparación con el control ($0,41 \pm 0,05$ y $0,43 \pm 0,04$, respectivamente, P

= 0,063 y $P = 0,057$), sin embargo, las diferencias entre grupos no eran estadísticamente significativas. De igual modo, la BMD de conejos AIA era más baja que la de OA, aunque sin ser estadísticamente significativo. El valor de la BMD del grupo AIA+HFD ($0,34 \pm 0,02$) es la media de 2 ejemplares que alcanzaron una extensión aceptable pero no completa. El resto no se pudieron extender correctamente (Figura 12B).

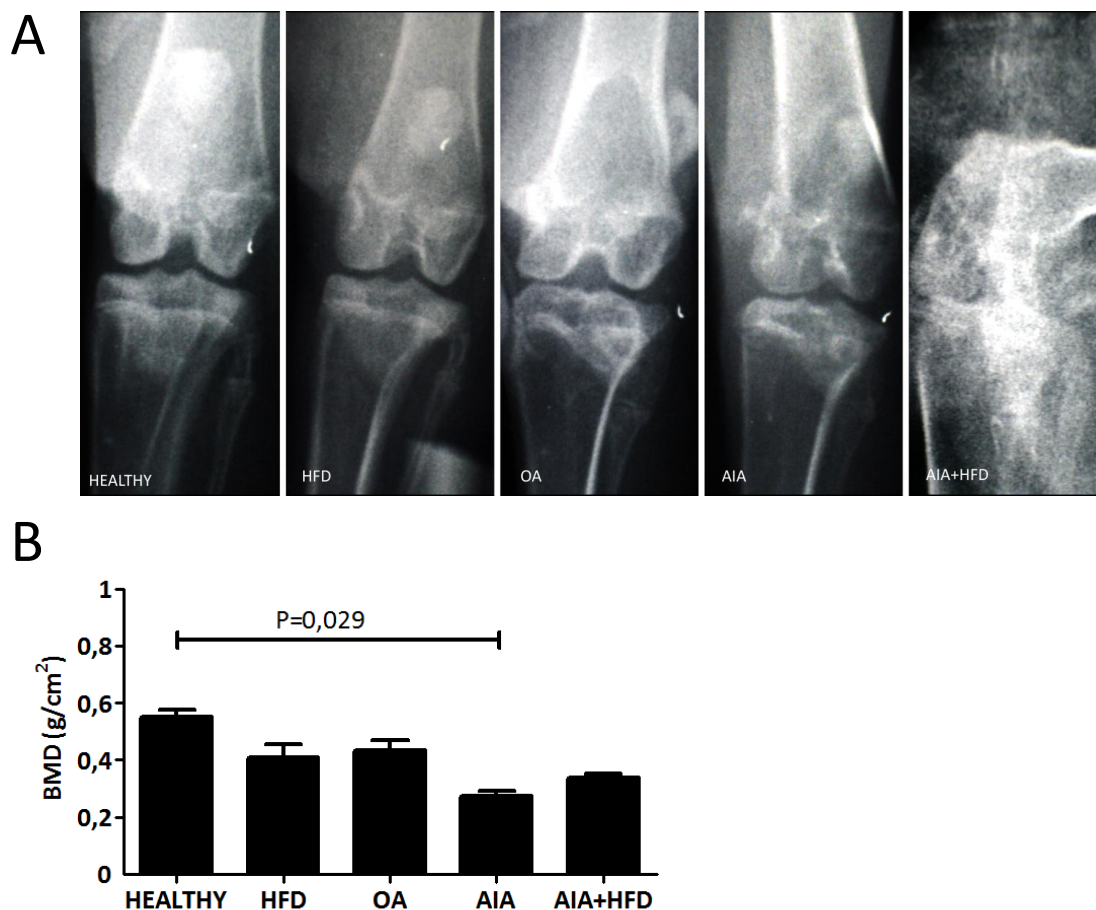


Figura 12. Evaluación radiológica y densitométrica de la pérdida ósea yuxta-articular. A, radiografía antero-posterior representativa de la rodilla de cada grupo de conejos. B, análisis densitométrico de la densidad mineral ósea subcondral (g/cm^2) en los distintos grupos experimentales.

Con el fin de reforzar nuestros resultados de los estudios de imagen se midió el espesor del hueso subcondral microscópicamente. Mediante una valoración histológica y semi-cuantitativa se confirmó la pérdida de hueso yuxta-articular en los conejos AIA. El hueso trabecular mostraba un aspecto delgado y discontinuo en comparación con el de los grupos sanos y OA, que se usaron como controles en este estudio (Figura 13A). Para demostrar que la pérdida de hueso era mayor en las zonas de la interfaz hueso-pannus frente a las zonas de carga, se midió el espesor del hueso subcondral como se ha explicado en el apartado de métodos. Los resultados mostraron que el espesor del hueso era significativamente mayor en las zonas de carga que en las de la interfaz hueso-pannus en conejos sanos, mientras que en el grupo AIA, la pérdida ósea aparecía homogénea en las distintas regiones analizadas a lo largo de la superficie del cóndilo (Figura 13B).

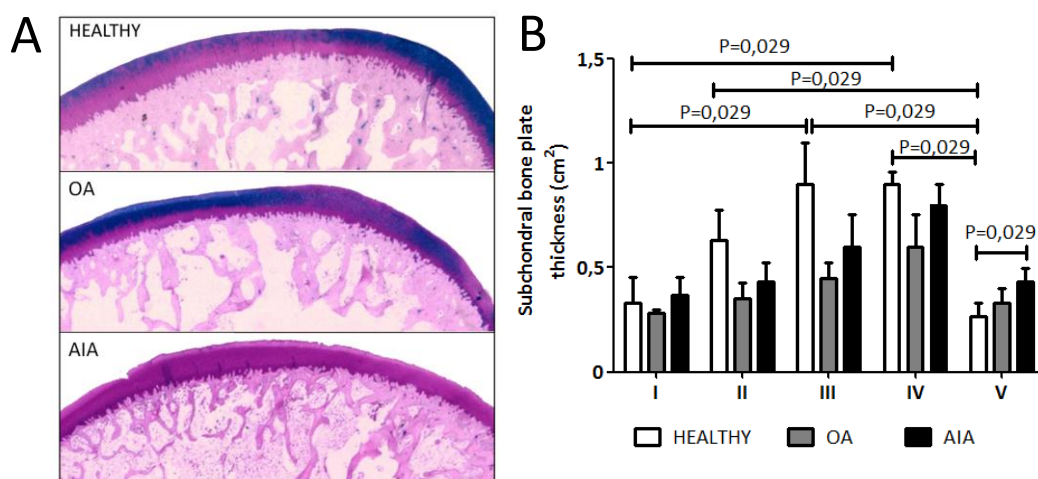


Figura 13. Valoración histológica del espesor del hueso subcondral. A, secciones representativas del hueso subcondral en las regiones de carga del cóndilo femoral, tinción azul alcian-PAS. B, análisis del espesor del hueso subcondral en las cinco regiones diferentes definidas en los métodos de este estudio.

2.2. Osteoclastogénesis por medida directa de tinción TRAP

Datos preliminares de nuestro estudio en humanos, nos permitieron estudiar la presencia de osteoclastos por medida directa de tinción TRAP en el hueso subcondral de cóndilos tibiales. De esta manera podríamos justificar la pérdida ósea yuxta-articular por una elevada actividad osteoclastogénica.

La semi-cuantificación global del cóndilo mostró un número de osteoclastos significativamente más elevado de los grupos OANI, OAI y RA frente a los controles PM ($P < 0,001$). La tinción TRAP del grupo AR estaba también aumentada en relación a OANI ($P = 0,007$). En las puntuaciones parciales por partes, se observó una cantidad de TRAP decreciente desde la parte más externa a la más interna (de 1 a 3), siendo la parte 1 la que mostraba mayor cantidad de TRAP.

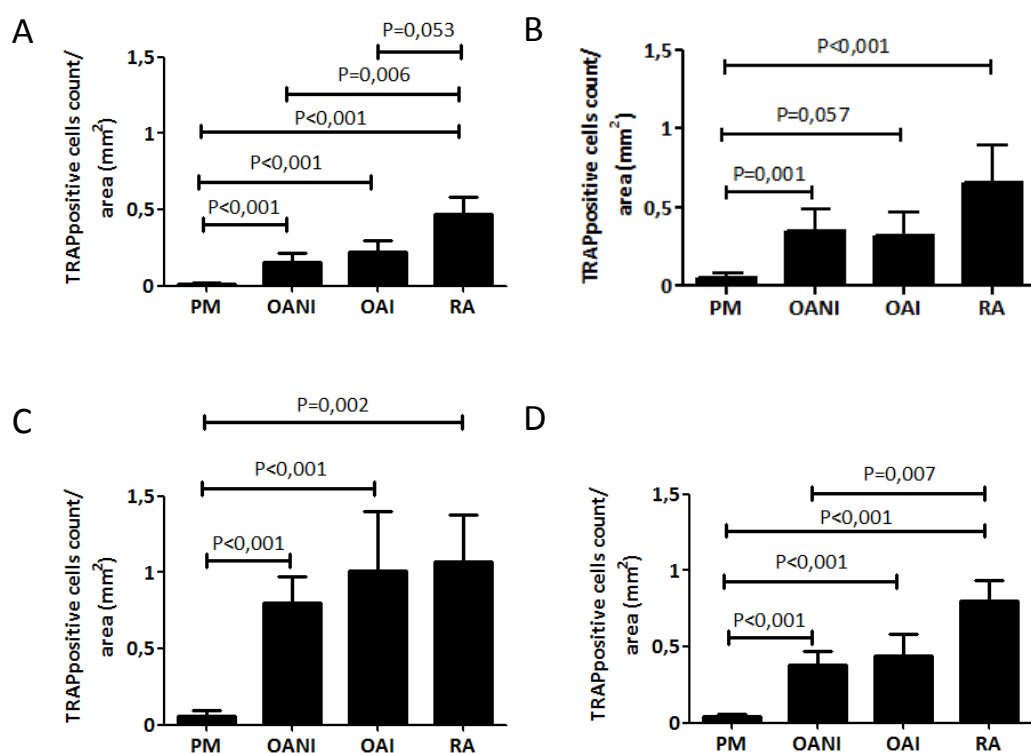


Figura 14. Osteoclastogénesis subcondral por medida directa de tinción TRAP. A-D, semi-cuantificación de las partes de cóndilo tibial más externa (A), media (B), interna (C) y la suma de todas las partes como puntuación global (D).

2.3. Valoración histológica del daño del cartílago articular

Evaluamos el daño del cartílago articular para analizar la zona de comunicación entre los condrocitos articulares y las células del SMF, pudiendo así observar qué capa del cartílago articular realizaría dicha interacción con más eficiencia, debido a la intensa degeneración tisular que producían las lesiones articulares inducidas experimentalmente.

La valoración histopatológica de las alteraciones del cartílago articular mostró unas puntuaciones significativamente más elevadas de los grupos OA, AIA y AIA+HFD en comparación con los grupos sanos y HFD ($P < 0,05$) (Figura 15). Pese a no identificar la *tidemark* en todos los casos, ésta se veía rebasada por estructuras vasculares en algunos conejos de los grupos AIA y AIA+HFD. En este tipo de estructuras se observó la presencia de células multinucleadas en contacto con el cartílago calcificado (Figura 16).

El daño del cartílago articular se relacionó significativamente de forma inversa con la BMD medida en el hueso subcondral, siendo $r = -0,829$ y $P = 0,021$.

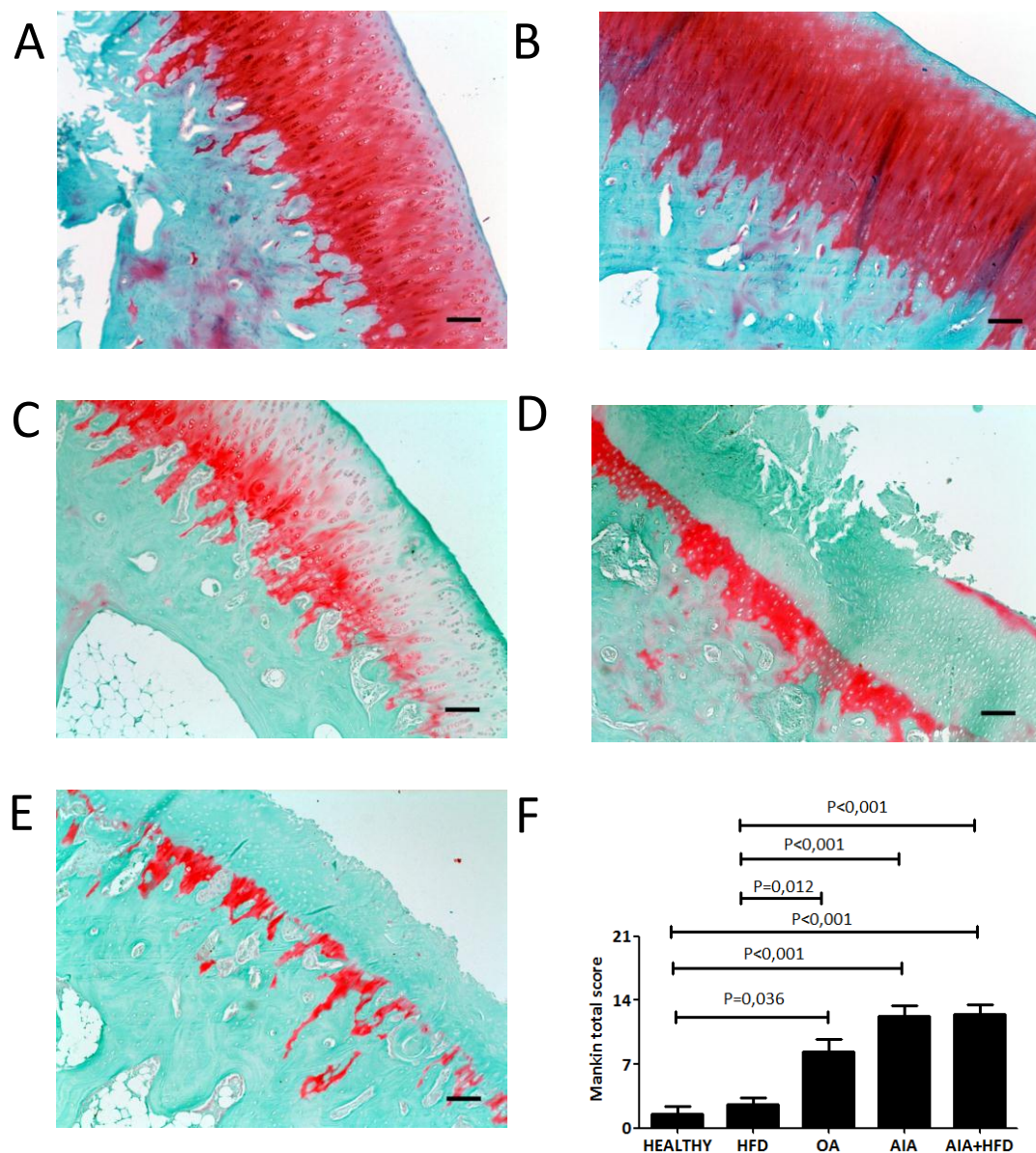


Figura 15. Valoración histológica del daño en el cartílago articular. A-E, secciones representativas de conejos sanos (A), HFD (B), OA (C), AIA (D) y AIA+HFD (E), tinción safranina-O-fast green, escala = 100 μ m. F, puntuación global del daño del cartílago articular valorada en la región de carga de los cóndilos femorales.

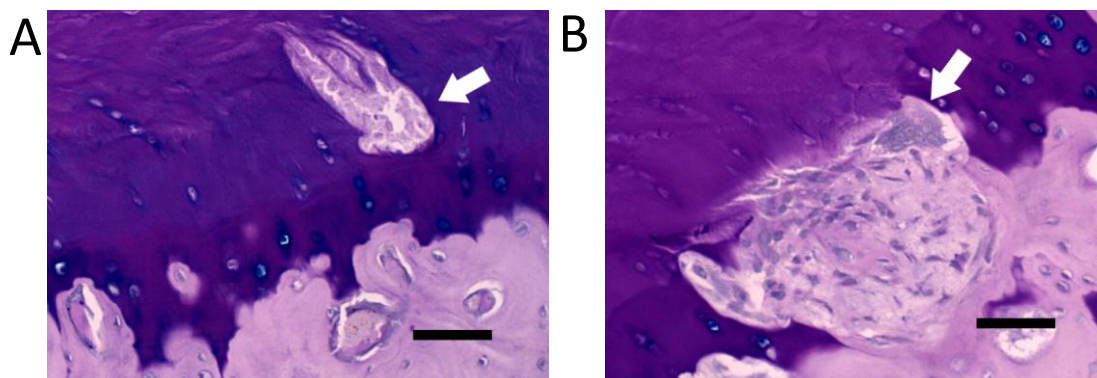


Figura 16. Detalle de la integridad de la *tidemark*. A, Estructura vascular situada por encima de la *tidemark* en conejos AIA. B, Estructuras mesenquimales y vasculares rebasando la *tidemark* con presencia de células multinucleadas en contacto con el cartílago calcificado. Tinción azul alcian-PAS, escala = 50 μ m.

2.4. Expresión proteica del RANKL y de la OPG

Debido a su directa implicación en la osteoclastogénesis y a que nuestro laboratorio había descrito previamente su expresión en condrocitos humanos artrósicos decidimos estudiar la expresión de RANKL y OPG en cartílago, hueso y sinovial de los grupos sanos, OA y AIA. Los resultados confirmaron que el cartílago articular de conejos sanos expresaba tanto RANKL como OPG, al igual que los grupos OA y AIA. La expresión de RANKL y OPG fue significativamente más elevada en el cartílago de conejos AIA frente al de los grupos OA y sanos ($P = 0,017$ y $P < 0,001$, para RANKL y OPG) (Figura 17). El ratio RANKL/OPG estaba significativamente más elevado en el cartílago de conejos AIA respecto al de conejos sanos ($6,20 \pm 0,81$ frente a $2,41 \pm 0,59$, $P = 0,009$). No se encontraron diferencias significativas entre los ratios del grupo AIA y el de OA ($3,84 \pm 0,52$) ($P = 0,063$). El ratio de AIA comparado con el de sanos en hueso ($6,56 \pm 0,60$ frente a $5,88 \pm 1,48$; $P = 0,397$) y en sinovial ($5,21 \pm 0,38$ frente a $5,14 \pm 1,02$; $P = 0,613$) no estaba incrementado. Se encontraron asociaciones significativas en el cartílago entre la expresión proteica del RANKL y la BMD subcondral ($r = -0,891$, $P < 0,001$), y entre el ratio RANKL/OPG y la BMD ($r = -0,736$, $P = 0,01$).

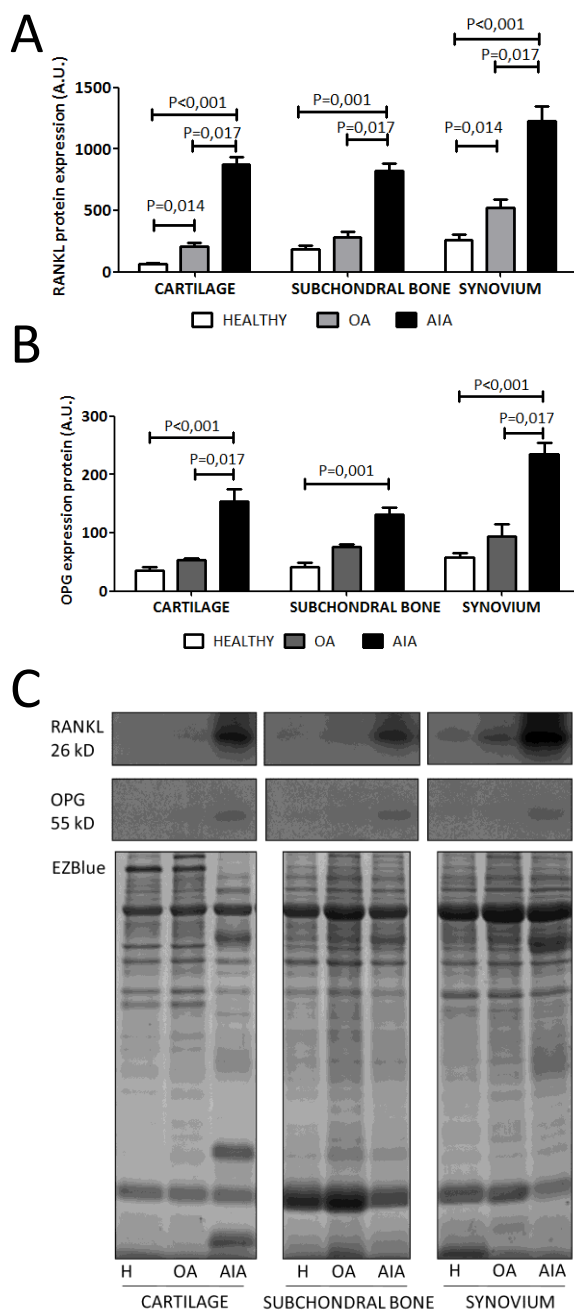


Figura 17. Expresión del RANKL y de la OPG en cartílago articular, hueso subcondral y membrana sinovial. Análisis densitométrico de la expresión de RANKL (A) y OPG (B) en el cartílago, hueso subcondral y membrana sinovial. C, Imágenes representativas de western blot para la detección de RANKL y OPG en los tres tejidos articulares. Se usaron geles teñidos con EZBlue como controles de carga en los distintos grupos de conejos.

2.5. Localización del RANKL y la OPG en el cartílago articular

Tras analizar la expresión de dichos mediadores, detectamos mediante inmunohistoquímica su localización en el cartílago articular con el objetivo de acotar las capas dónde se expresaría más abundantemente el RANKL y la OPG.

Se observó que la expresión del RANKL en el cartílago de conejos sanos era intracelular y más intensa en la capa superficial y media que en la capa profunda. En el cartílago calcificado su expresión era más moderada, localizándose en su mayoría en los condrocitos cercanos a estructuras mesenquimales. En el cartílago de conejos OA, se observó el mismo patrón de distribución que en los conejos sanos, aunque con una expresión ligeramente más fuerte (figuras 18 A, C y E). En el cartílago articular de conejos AIA, la expresión del RANKL era predominantemente intracelular, sin embargo, se apreciaba una evidente expresión extracelular, concretamente en la proximidad de estructuras vasculares cercanas a la capa de cartílago calcificado (figura 18 G).

En relación a la distribución de la OPG, se observó una clara distribución en las capas profundas del cartílago articular de conejos sanos. Su localización era muy parecida en el cartílago de conejos OA y AIA, pero con una intensidad de la tinción más marcada (figuras 18 B, D y F).

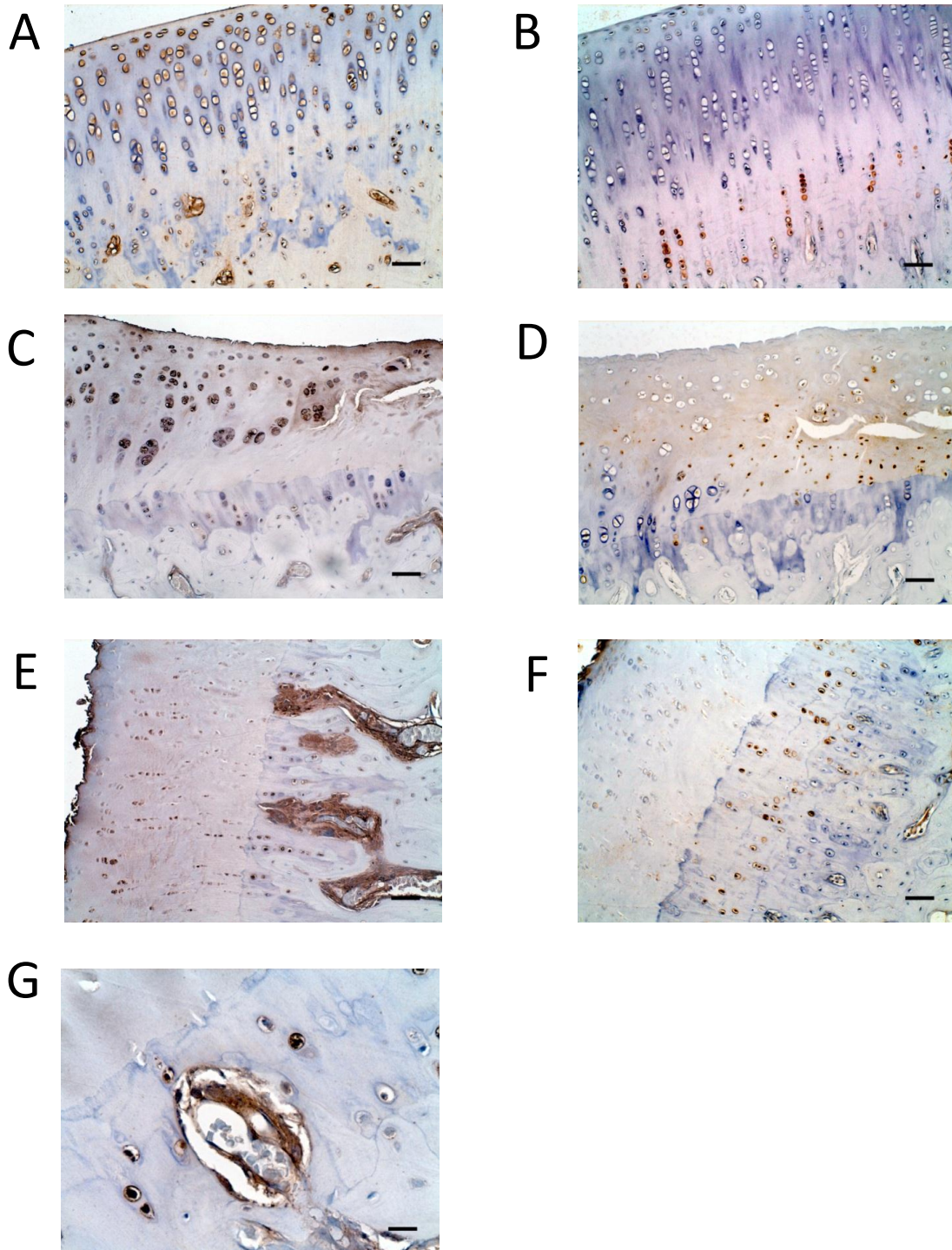


Figura 18. Patrón de distribución del RANKL y de la OPG en el cartílago articular. Secciones representativas de tinciones específicas para RANKL en cartílago articular de conejos sanos (A), OA (C) y AIA (D). El patrón de distribución de la OPG en el cartílago de conejos sanos (B), OA (D) y AIA (F), escala = 50 μ m. G y H, detalle de la expresión extracelular del RANKL y localización próxima a estructuras vasculares en la región osteocondral, escala = 25 μ m.

3. La hipercolesterolemia incrementa la destrucción articular en la artritis crónica. Modelo experimental agravado por la infiltración de células espumosas

En nuestro estudio de humanos, se observó que algunas células del SMF tenían especial atracción por las células del tejido adiposo. Su concreta disposición rodeando y abrazando a los adipocitos y el aspecto espumoso de su citoplasma sugería una estrecha relación entre ambos. Puesto que la dislipidemia, uno de los factores del síndrome metabólico, condiciona en parte el incremento de complicaciones cardiovasculares en pacientes con AR, nos planteamos estudiar si de igual modo podría contribuir a dañar los tejidos articulares en la progresión de la artritis. Decidimos combinar nuestro modelo experimental de artritis con la administración de una dieta enriquecida en colesterol para simular una situación hiperlipidémica para estudiar sus consecuencias en la progresión de la lesión articular.

3.1. Perfil metabólico

En primer lugar, analizamos el perfil metabólico de los conejos. Los conejos alimentados con una dieta rica en grasa (grupos HFD y AIA+HFD) mostraron niveles de colesterol total y HDL en suero significativamente más elevados que los conejos sanos ($P < 0,01$). Los niveles de colesterol, HDL y triglicéridos de conejos AIA+HFD estaban significativamente aumentado respecto a los grupos AIA y OA ($P < 0,01$) (Tabla 2). El peso en kg, en el momento del sacrificio, de los conejos HFD, OA, AIA y AIA+HFD ($3,54 \pm 0,19$; $3,92 \pm 0,11$; $3,23 \pm 0,22$ y $3,28 \pm 0,12$) estaba significativamente disminuido en comparación con el peso de los conejos sanos ($4,28 \pm 0,06$; $P < 0,03$). El peso de conejos AIA y AIA+HFD también estaba significativamente reducido frente al peso medio del grupo OA ($P < 0,05$).

Tabla 2. Efecto de la dieta hiperlipidémica en el perfil lipídico del modelo experimental. Niveles de colesterol total, colesterol HDL y triglicéridos en mg/L medidos en el suero sanguíneo de los grupos sano (HEALTHY), con dieta enriquecida en grasa (HFD), con artrosis, con artritis inducida por antígeno (AIA) y con AIA+HFD (n = 7-9 conejos por grupo).

	HEALTHY	HFD	OA	AIA	AIA+HFD
Colesterol total (mg/dl)	51 ± 1	1467 ± 242*	57 ± 12	60 ± 6	1825 ± 197*#&
HDL (mg/dl)	17 ± 2	135 ± 25*	22 ± 2	23 ± 3	147 ± 34*#&
Triglicéridos (mg/dl)	124 ± 22	205 ± 61	86 ± 20	105 ± 28	266 ± 53#&

*P<0,01 vs. HEALTHY; #P<0,01 vs. OA; & P<0,01 vs. AIA

3.2. Niveles de CRP

A continuación, analizamos un marcador de inflamación sistémica para conocer si podrían existir alteraciones de la misma en los conejos alimentados con la dieta enriquecida en grasa. Los niveles de CRP estaban significativamente incrementados en el suero de conejos AIA y AIA+HFD en comparación con los niveles del grupo sano y OA (P = 0,011, P <0,001 y P = 0,021, P <0,001, respectivamente). Los niveles del grupo AIA+HFD también estaban aumentados frente a los de conejos HFD. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la CRP de sueros de conejo AIA y AIA+HFD, sin embargo, los niveles del grupo AIA+HFD siempre se hallaron por encima del valor umbral 30 mg/L, mientras que los de AIA no (Figura 19).

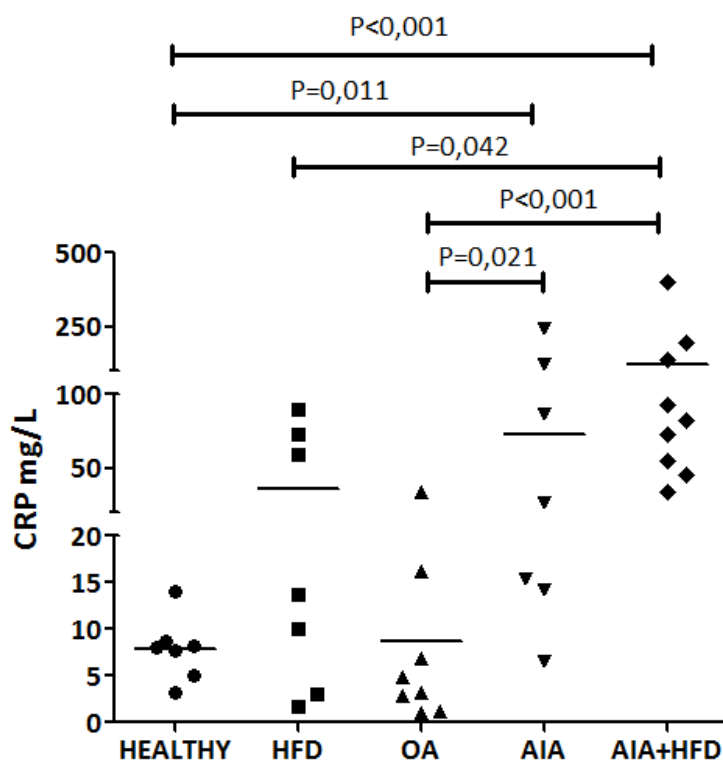


Figura 19. Concentración de proteína C reactiva en $\mu\text{g/mL}$ en el suero de los conejos experimentales. Las barras representan los valores medios ($n = 7-9$ conejos por grupo)

3.3. Aumento de la sinovitis

Una vez analizados los niveles lipídicos y de inflamación sistémica en suero nos centramos en analizar los efectos de la dieta hiperlipidémica en la membrana sinovial para poder estudiar la repercusión que tendría sobre las células del SMF.

En la membrana sinovial del grupo HFD se observó un leve crecimiento de la capa íntima acompañado en ocasiones de células espumosas de pequeño tamaño, estando el score de Krenn total significativamente incrementado frente al grupo control ($P = 0,005$). El grupo OA mostró un valor total de sinovitis significativamente mayor que los conejos sanos ($P = 0,001$) mientras que los grupos AIA y AIA+HFD alcanzaron un valor máximo en la escala de valoración mostrando fuertes cambios sinoviales en relación con los controles, como una notable hiperplasia de la íntima, infiltrado de células mononucleares en la subíntima y la aparición de agregados linfocitarios, ocasionalmente organizados en nódulos linfoides (Figura 20).

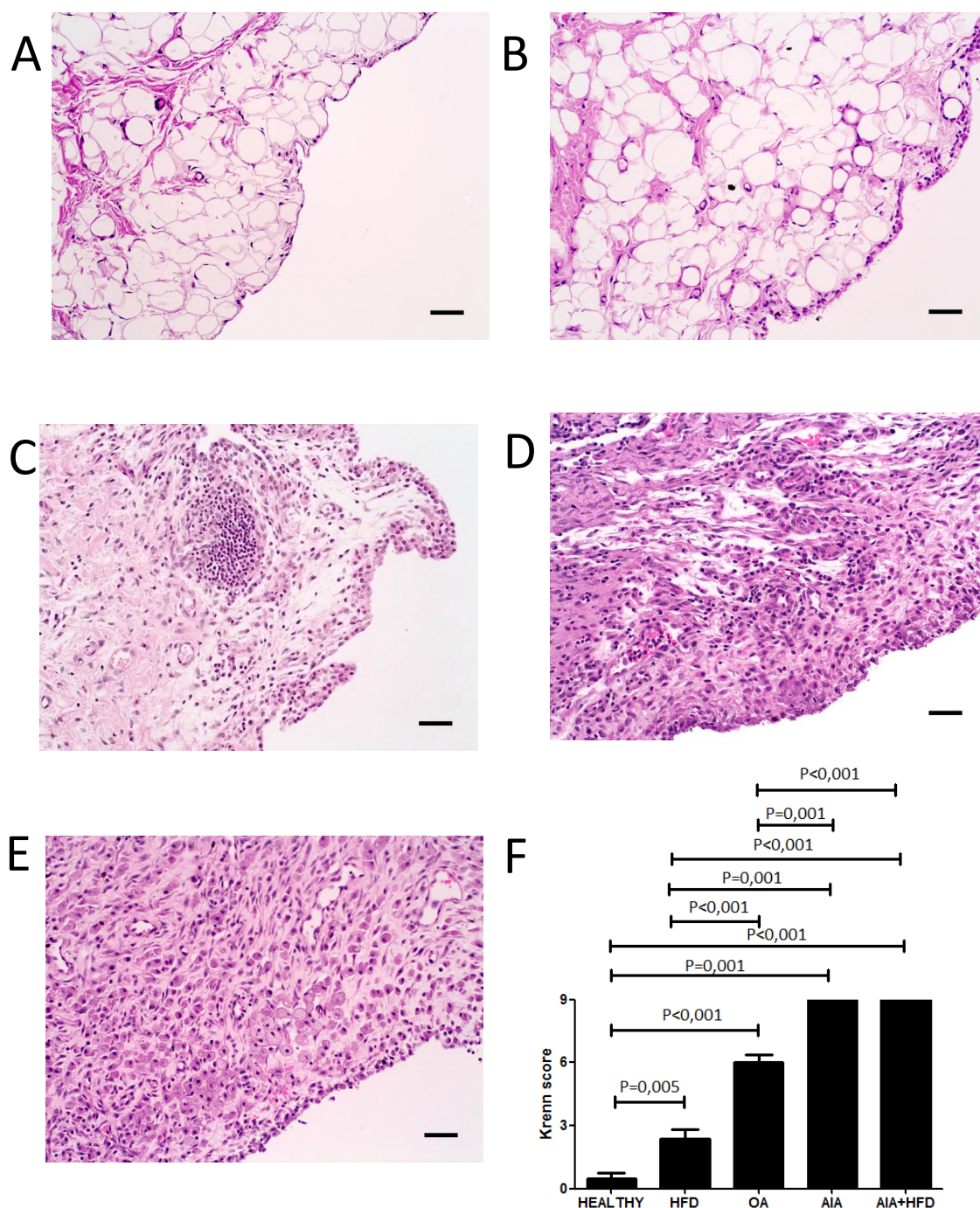


Figura 20. Histopatología de la membrana sinovial. A-E, Secciones representativas de las membranas sinoviales teñidas con H-E de los grupos HEALTHY (A), con dieta hiperlipidémica (HFD)(B), con OA (C), con artritis inducida por antígeno (AIA)(D) y con AIA+HFD (E), escala = 50 μm. F, Puntuación total del grado de sinovitis (las barras representan el valor medio y el error estándar de la media, n = 7-9 conejos por grupo).

3.4. Infiltrado masivo de macrófagos y presencia de células espumosas

Pese a que las membranas sinoviales de conejos AIA y AIA+HFD mostraron el grado máximo de sinovitis, la sinovial del grupo AIA+HFD se caracterizó por un infiltrado masivo de células RAM-11 positivas cuya presencia demostró ser significativamente mayor que la del grupos AIA, OA, HFD y sano ($P = 0,001$) (Figura 21 A-F). Otra particularidad relevante de estas células fue la apariencia espumosa de su citoplasma. La tinción positiva con Oil red O confirmó la presencia de células espumosas en la sinovial AIA-HFD, mostrando una clara diferencia entre las sinoviales AIA y AIA+HFD respecto a la presencia de este tipo celular. Se detectaron células espumosas tanto en la capa subíntima como en la íntima, siendo esta última localización una característica patognomónica del grupo AIA+HFD (Figura 22 A-E).

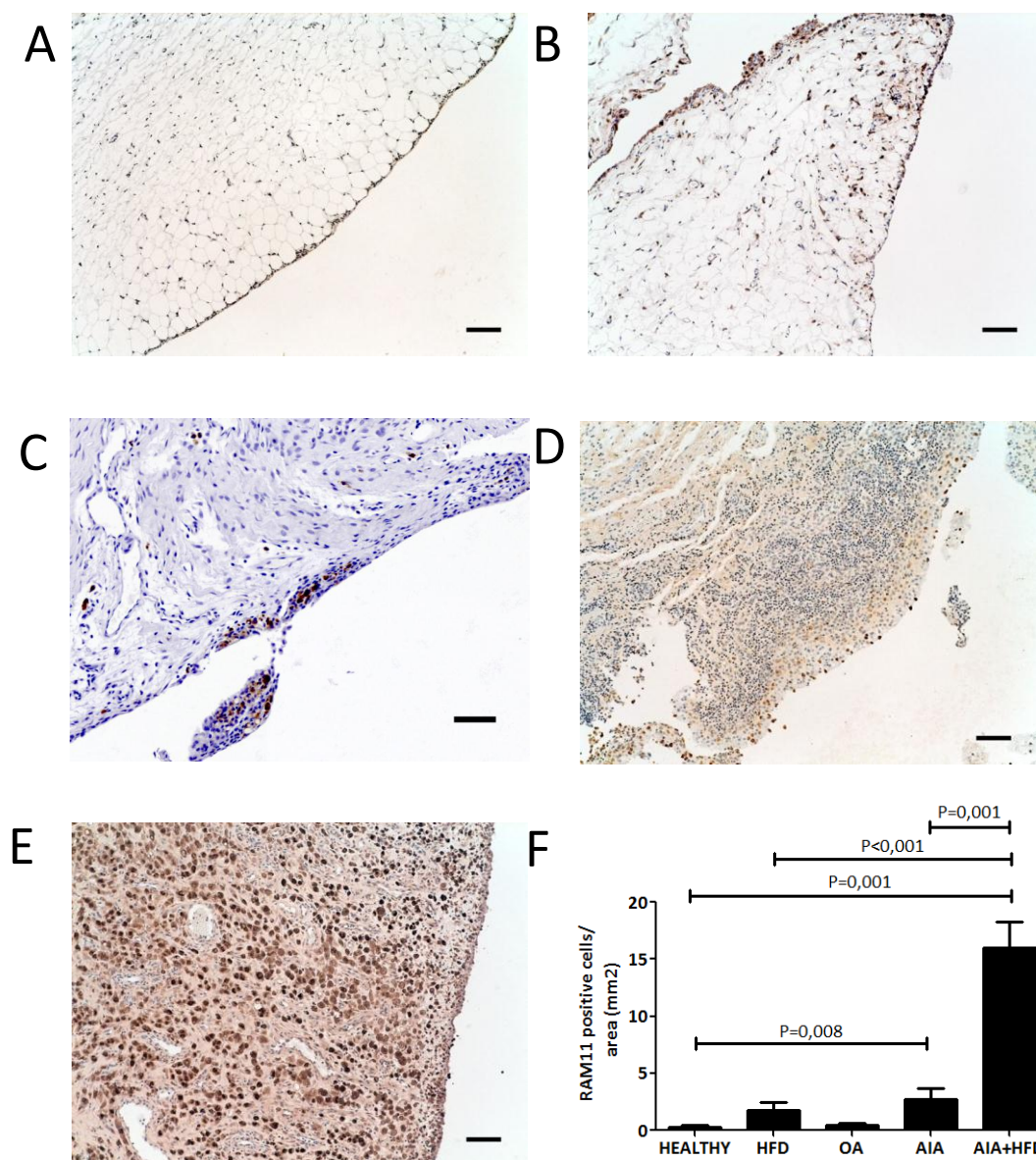


Figura 21. Inmunotinción de los macrófagos sinoviales. A-E, Secciones representativas de las membranas sinoviales teñidas con el marcador específico de macrófago de conejo RAM-11 de los grupos HEALTHY (A), con dieta enriquecida en grasa (HFD)(B), con OA (C), con artritis inducida por antígeno (AIA)(D) y con AIA+HFD (E), escala = 100 μ m. F, Semi-cuantificación de las células RAM-11 positivas en la sinovial de cada grupo de conejos (las barras representan el valor medio y el error estándar de la media, n = 7-9 conejos por grupo).

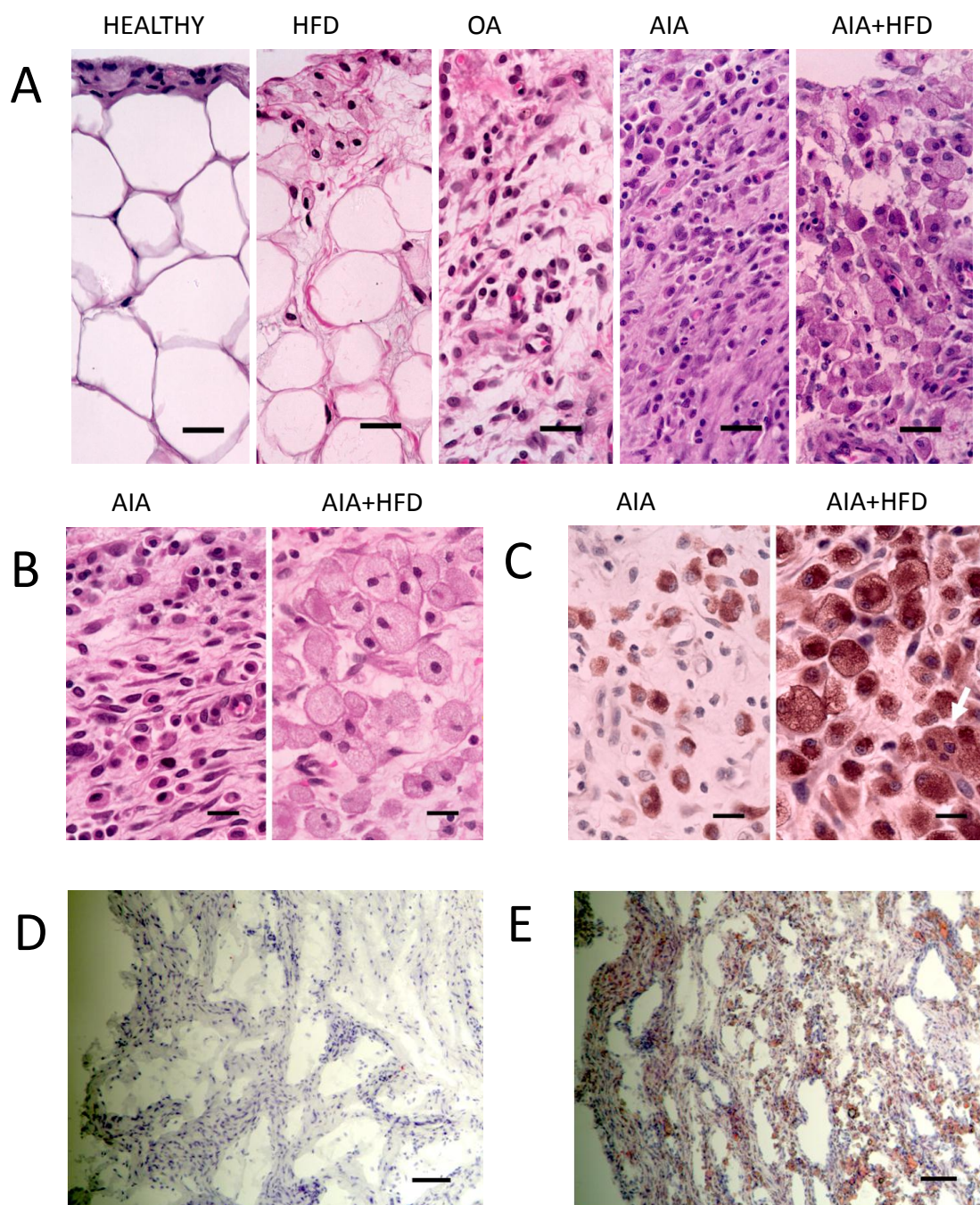


Figura 22. Detalle del infiltrado sinovial. A, Secciones representativas teñidas con H-E del infiltrado sinovial observado en cada grupo, escala = 50 μ m. B y C, células espumosas de gran tamaño, RAM-11 positivas, en la sinovial de conejos AIA+HFD comparado con las observadas en AIA. D y E. Tinción Oil red O de las sinoviales del grupo AIA (D) y AIA+HFD (E), escala = 100 μ m.

3.5. Presencia de células multinucleadas reabsorbiendo tejido adiposo

Al igual que en las sinoviales humanas inflamadas, se observaron MΦ RAM-11 positivos rodeando adipocitos en la membrana sinovial de los conejos HFD, AIA y con mayor frecuencia en el grupo AIA+HFD. Se identificaron TGC abrazando y englobando estructuras adiposas en el grupo AIA+HFD (Figura 23 A, B y C). El resto de tipo morfológicos, LGC y FBGC se observaron cerca de cuerpos extraños y depósitos de fibrina (Figura 24). No se detectaron PGC en ninguno de los grupos. El número de MGC estaba significativamente aumentado frente a las pocas células multinucleadas observadas en la sinovial de conejos AIA ($P < 0,001$) (Figura 23D). Estas MGC se observaron en la capa subíntima, en ocasiones en la íntima y en la proximidad de la región de pannus.

Algunas MGC se tiñeron positivamente para catepsina K en la interfaz hueso-pannus sin estar en contacto con superficies óseas (Figura 23 E), mientras que las MGC que tocaban el hueso si expresaron este marcador. No se observaron MGC positivas para catepsina K en la sinovial de conejos AIA y AIA+HFD, sin embargo, si se detectaron puntualmente algunas células mononucleares catepsina K positivas.

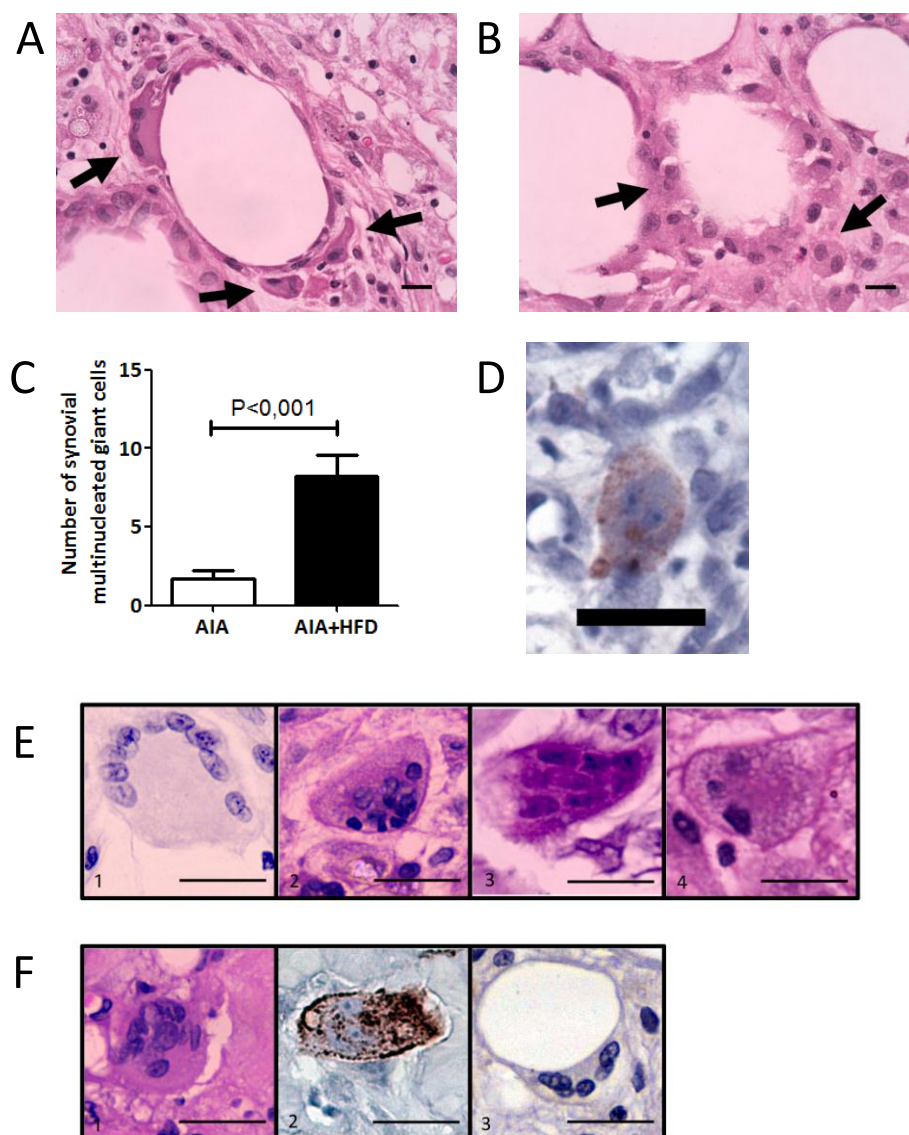


Figura 23. Células multinucleadas gigantes absorbiendo tejido adiposo. A y B, Células multinucleadas gigantes (MGC) envolviendo adipocitos en la sinovial de conejos AIA+HFD, tinción H-E, escala = 25 μ m. C, Número absoluto de MGC en la sinovial de conejos AIA y AIA+HFD (barra blanca y negra, respectivamente). D, MGC positiva para catepsina K circulando por la sinovial hacia el hueso pero sin contactar con la superficie ósea en la región de pannus. E, Identificación nuclear de las diferentes MGC de tipo Langhans (1), de tipo cuerpo extraño (2), de tipo osteoclasto (3) y de tipo Touton (4) en sinovial inflamada de conejo, tinción H-E. B, Se detectaron MGC asociadas a dianas específicas, como depósitos de fibrina (1), hueso (2, inmunoreactivas para catepsina K) y adipocitos (3). Escala = 25 μ m

3.6. Incremento de la angiogénesis

Otra de las características que diferenciaba las sinoviales de los distintos grupos fue la vascularización. El análisis inmunohistoquímico para CD31 confirmó un incremento significativo de la vascularización en la sinovial de los conejos AIA+HFD en comparación con el resto de grupos. De igual modo el número de vasos teñidos estaba significativamente aumentado en los grupos OA, AIA y AIA+HFD en relación con los controles sanos y HFD. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la sinovial de conejos HFD frente a los sanos (Figura 24).

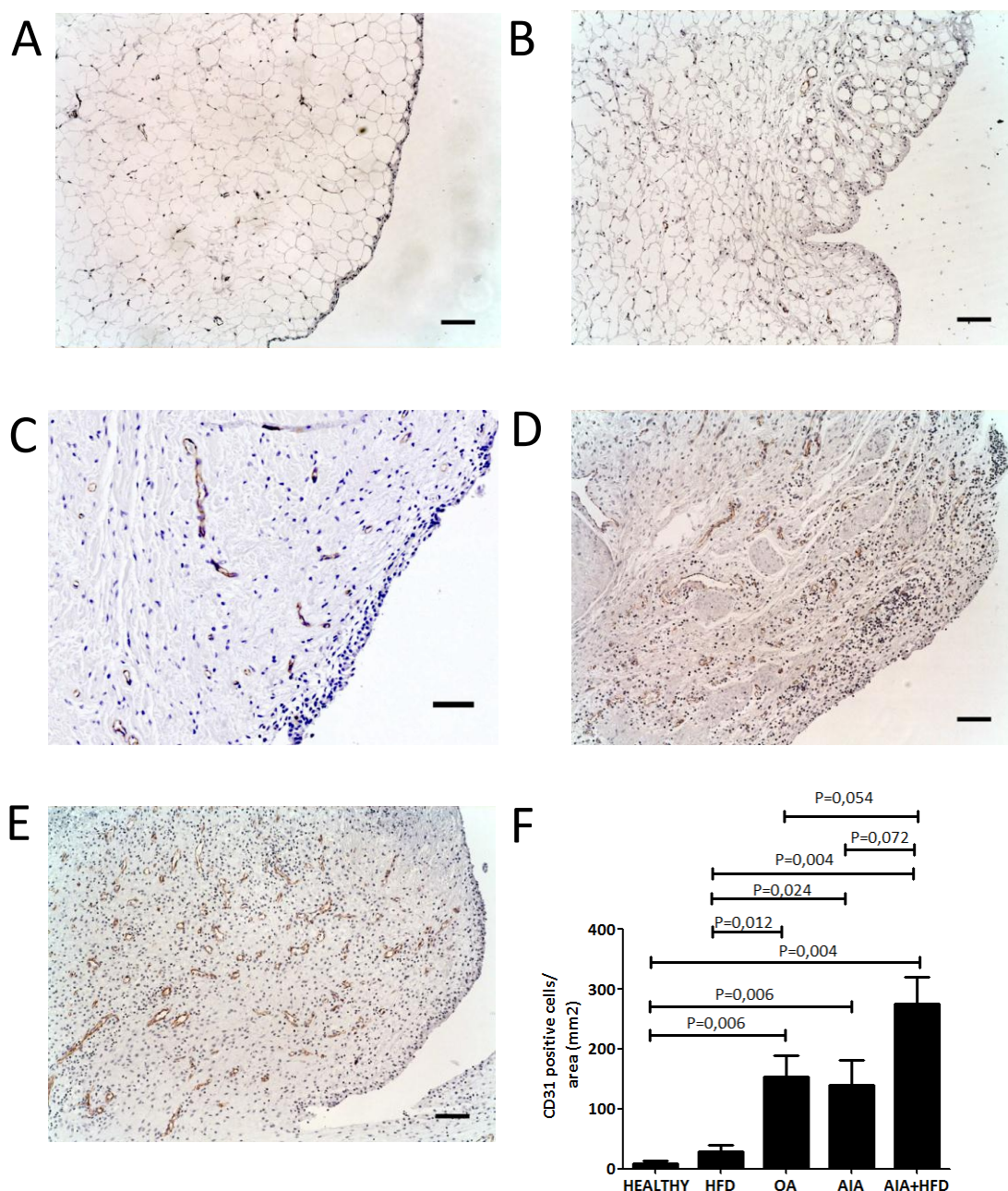


Figura 24. Inmunotinción de la angiogénesis sinovial. A-E, Secciones representativas de las membranas sinoviales teñidas con el marcador específico de células endoteliales CD31 de los grupos sanos (A), con dieta enriquecida en grasa (HFD)(B), con OA (C), con artritis inducida por antígeno (AIA)(D) y con AIA+HFD (E), escala = 100. F, Semi-cuantificación de las células CD31 positivas en la sinovial de cada grupo de conejos (las barras representan el valor medio y el error estándar de la media, $n = 7-9$ conejos por grupo).

3.7. Incremento de la resorción ósea

Las sinoviales inflamadas de los conejos AIA+HFD presentaban un grado de sinovitis similar al de conejos AIA, pero con unas características distintas según revelaba el análisis histopatológico por la presencia de un infiltrado masivo macrofágico, constituido principalmente de células espumosas y multinucleadas. Nos planteamos si este infiltrado inflamatorio característico del grupo AIA+HFD afectaría por igual a la resorción ósea en la interfaz hueso-pannus.

Los resultados de la resorción ósea mostraron una mayor presencia de células tipo osteoclasto en contacto con el hueso, teñidas positivamente para catepsina K, en la sinovial de los conejos AIA+HFD respecto a la sinovial de conejos AIA ($P = 0,015$) (Figuras 25 A, B y C). La superficie de contacto entre hueso y pannus era significativamente superior en los conejos AIA+HFD en relación a la observada en AIA ($P = 0,031$) (Figura 25 D). En esa misma región de la interfaz hueso-pannus se analizó la cantidad de tejido invasivo y de hueso. La extensión de sinovial de conejos AIA+HFD estaba más aumentada que en la de conejos AIA, mientras que el área de hueso era menor en AIA+HFD comparado con AIA (figura 25E).

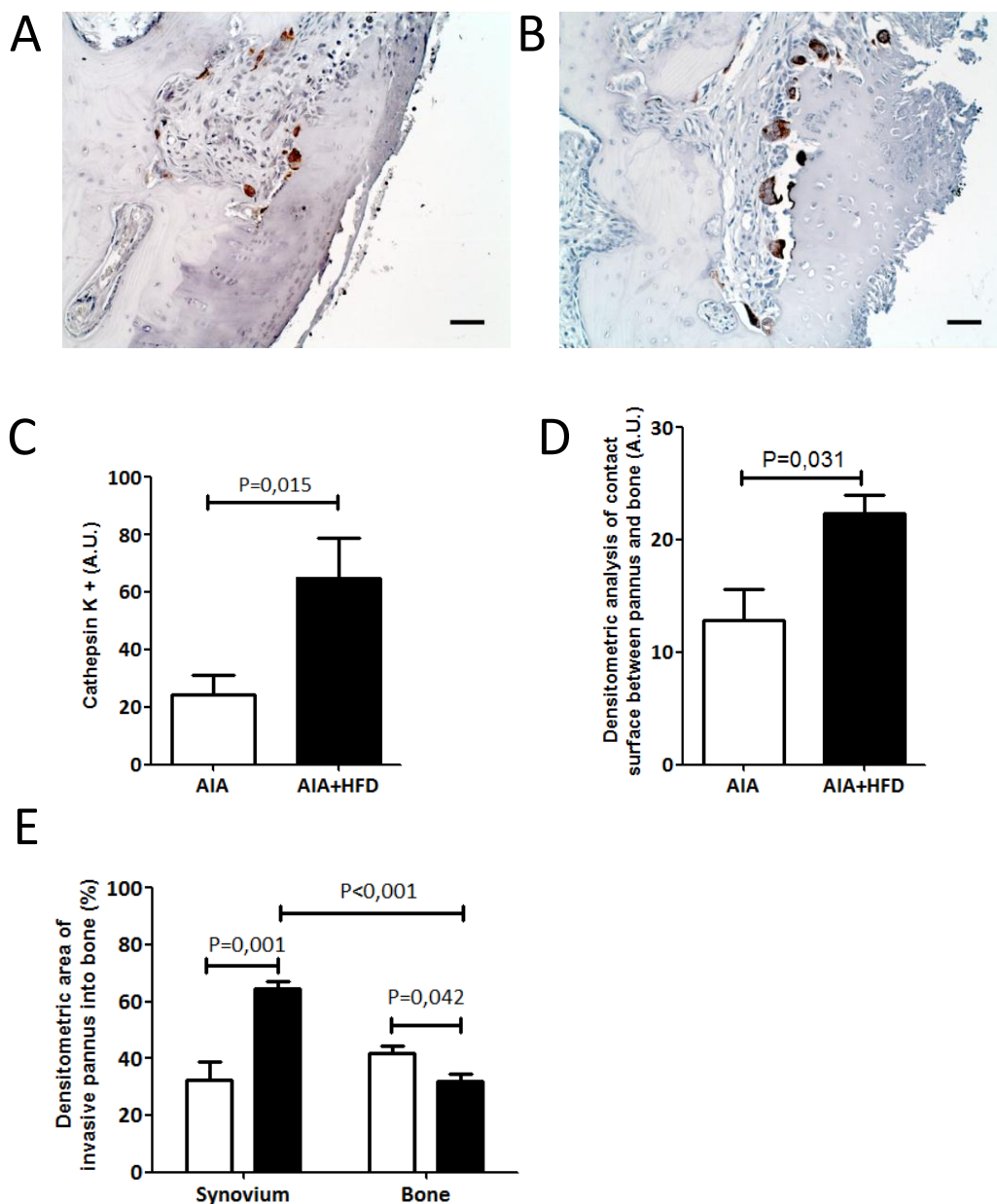


Figura 25. Resorción ósea activa. A y B, Secciones representativas de la interfaz hueso-pannus con células positivas para catepsina K mostrando una actividad de reabsorción del hueso en el grupo AIA y en AIA+HFD, escala = 50 μ m. C, Secciones características de la superficie de contacto entre hueso y pannus, y de las áreas del pannus invasivo penetrando en el hueso, correspondiendo las secciones superiores al grupo AIA y las inferiores a AIA+HFD. D, Semi-cuantificación de las células catepsina K positivas en el pannus de conejos AIA y AIA+HFD, barra blanca y negra, respectivamente. E y F, Análisis densitométrico de la superficie de contacto entre hueso y pannus, y del área de sinovial invasiva y hueso.

3.8. Incremento de la expresión génica de TNF- α y MCP-1

A continuación, estudiamos la expresión génica de marcadores pro-inflamatorios que pudiesen explicar esa mayor resorción ósea que se había observado en la región de la interfaz hueso-pannus.

Los grupos HFD, AIA y AIA+HFD mostraron un incremento significativo de la expresión génica en membrana sinovial de TNF- α en relación con el grupo sano ($P < 0,05$). Los niveles de expresión de MCP-1 de la sinovial de conejos HFD y AIA también estaban aumentados significativamente respecto al de sanos ($P < 0,02$), pero los niveles del grupo AIA+HFD eran menores que los del grupo AIA (Figura 26). No se han representado los resultados del grupo OA por no disponer de las muestras en el momento del análisis.

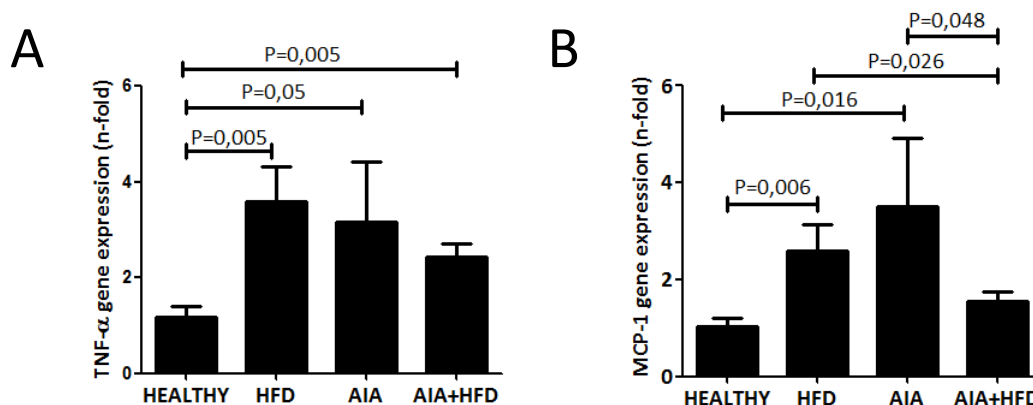


Figura 26. Expresión génica de TNF- α y MCP-1 en la membrana sinovial. A, Niveles de TNF- α . B, Niveles de MCP-1. Los niveles están expresados como número de veces inducido respecto a los valores del grupo sano. Las barras representan el valor medio y el error estándar de la media ($n = 7-9$ conejos por grupo)

3.9. Incremento de la expresión proteica del RANKL en la sinovial

Tras estudiar la expresión proteica del RANKL producida en el cartílago articular y su efecto en la comunicación condrocito-células del SMF, nos centramos en estudiar

el efecto que tendría la dieta hiperlipidémica en su síntesis y lo comparamos con sus controles sin dieta.

La expresión proteica del RANKL de los conejos HFD estaba incrementada en cartílago, hueso subcondral y membrana sinovial en comparación con los valores de conejos sanos ($P = 0,001$; $P = 0,021$ y $P = 0,015$, respectivamente). Los niveles de RANKL en los conejos AIA y AIA+HFD estaban también aumentados en relación a sus controles sanos y HFD. Concretamente, en el tejido sinovial, los grupos AIA y AIA+HFD mostraron niveles similares de expresión pero significativamente aumentados respecto a sus controles sanos y HFD ($P < 0,001$ y $P < 0,001$) (Figura 27).

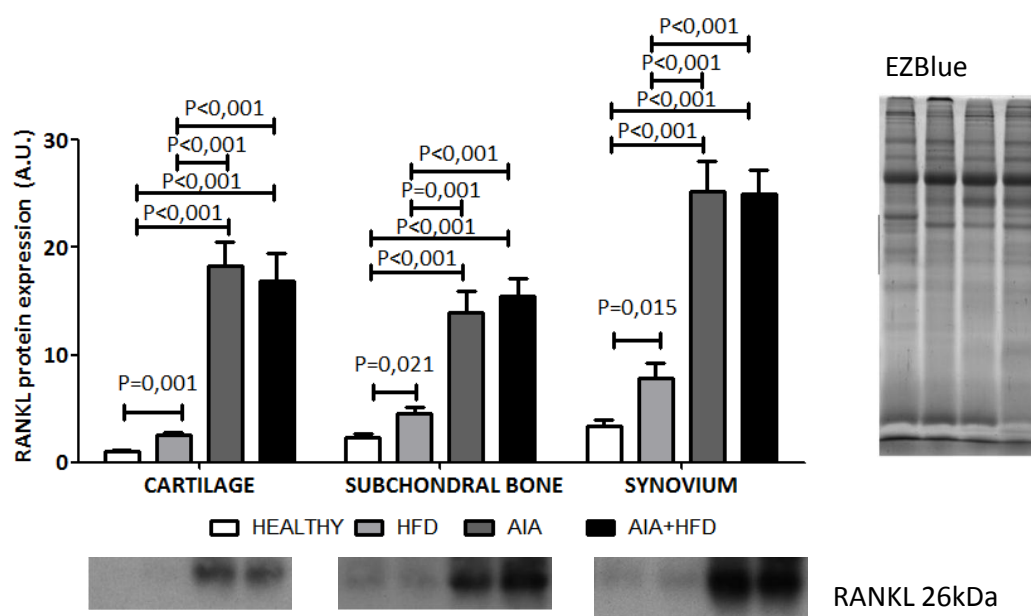


Figura 27. Efecto de la dieta hiperlipidémica en la expresión proteica del RANKL. Análisis densitométrico de la expresión del RANKL junto con imágenes representativas del western blot y los geles de EZBlue usados como controles de carga de los conejos sanos, HFD, AIA y AIA+HFD.

3.10. Caracterización de las células mononucleares de sangre periférica

Finalmente, nos propusimos estudiar si el alto contenido de lípidos en sangre podría alterar el comportamiento de las células mononucleares circulantes por la ingesta de pequeñas partículas lipídicas.

Los frotis de la sangre de conejos AIA+HFD mostraron que las células mononucleares de sangre periférica exhibían pequeñas gotas positivas para Oil Red O en el interior y perímetro celular, en contraste con la sangre de conejos AIA que no presentaba ninguna coloración positiva (Figura 28A y B).

Tras la tinción Oil Red O de las células adheridas se confirmó la presencia de vacuolas lipídicas teñidas positivamente para Oil red O en el grupo AIA+HFD, mientras que las del grupo AIA no se tiñeron (Figura 28C y D).

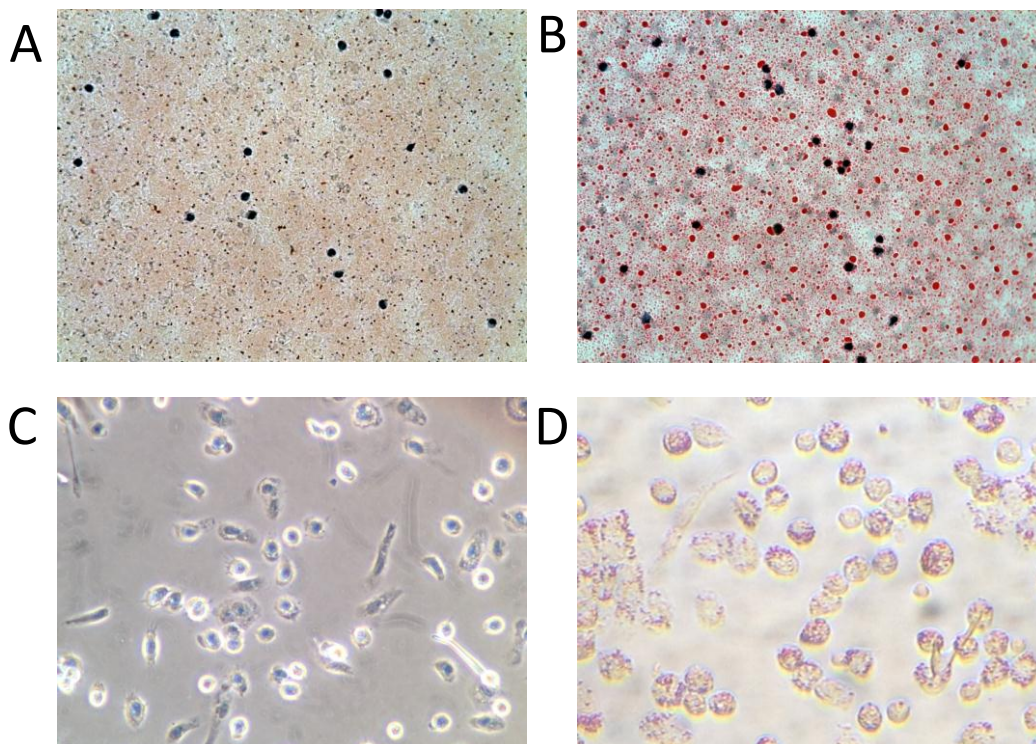


Figura 28. Absorción de partículas lipídicas por células mononucleares de sangre periférica. A, frotis sanguíneo de conejos AIA sin coloración positiva para Oil Red O. B, frotis de sangre de conejos AIA+HFD con coloración positiva para Oil red O. C, las células mononucleares de sangre periférica adheridas del grupo AIA no presentaron tinción positiva mientras que la mayoría de las células adheridas del grupo AIA+HFD (D) mostraron vacuolas lipídicas en su interior, normalmente organizadas en forma concéntrica.

V. Discusión

En este estudio hemos aportado hallazgos originales sobre la contribución del SMF a la patogenia de la artritis reumatoide y la OA humanas, así como en modelos experimentales de ambas enfermedades en conejos. En primer lugar, hemos comprobado la presencia del importante número de MGC en la AR y en la OA, relacionadas con la intensidad de la respuesta inflamatoria en ambas enfermedades. En segundo lugar, hemos mostrado que el RANKL producido por los condrocitos articulares puede ser una fuente suficiente como para modificar el remodelado del hueso subcondral incidiendo significativamente en el desarrollo de la pérdida ósea yuxta-articular característica de la AR. Por último, hemos observado que la hipercolesterolemia es un factor agravante de la destrucción articular de la artritis crónica, actuando a través de MΦ de aspecto espumoso. El modelo animal en el que estudiamos este mecanismo puede considerarse un modelo de artritis crónica impulsado por MΦ.

1. Células multinucleadas gigantes de la membrana sinovial de pacientes con AR y con OA

Respecto al primer estudio, hemos descrito los distintos fenotipos morfológicos de MGC en la sinovitis reumatoide y artrósica en humanos. Las LGC y FBGC aparecían con más frecuencia en la sinovial AR y la OA inflamada que en la OANI. De hecho, estas MGC eran los subtipos morfológicos predominantes, ambos equitativamente representados en la membrana sinovial reumatoide, mientras que LGC era el más abundante en OA. Por otro lado, la inflamación sinovial se correlacionó con la densidad de MGC y los diversos fenotipos se relacionaron con dianas específicas dentro de la sinovial reumatoide y artrósica, al igual que pudimos observar en el modelo animal experimental.

La existencia de diversos fenotipos de MGC ha sido descrita previamente en varias enfermedades autoinmunes e infecciosas o en granulomas inflamatorios como la sarcoidosis [42,136,146]. En este estudio, se detectaron en la membrana sinovial de pacientes con AR y con OA todos los distintos fenotipos de MGC descritos hasta el momento. Parece razonable conjeturar que el tipo de detritus tisular a eliminar

condicione cada uno de los diferentes fenotipos morfológicos observados. Las LGC o FBGC fueron identificadas en la membrana sinovial de conejos con artritis crónica y en la sinovial reumatoide y artrósica, próximas a depósitos de fibrina, restos de tejido y fagocitando hemosiderina. Estos tipos de detritus celulares han sido observados previamente en la sinovial inflamada, así como en otras enfermedades articulares [41], en las que se detectaron MGC próximas a focos de hemorragia asociados a liberación de hemosiderina [115]. Las MGC de tipo osteoclasto también han sido observadas en el pannus contiguo a las superficies del hueso en pacientes tanto con AR como con OA o en los conejos experimentales.

Las TGC se encontraron envolviendo y rodeando células adiposas tanto en sinovial humana como de conejo. Este tipo de MGC se han localizado con frecuencia en lesiones que contienen colesterol o depósitos de lípidos, como los xantomas o los xantogranulomas [43,62]. Se ha propuesto que las TGC se desarrollan cuando el estímulo a la fusión celular también se acompaña por un factor estimulante a la absorción de lípidos [8]. Por lo que la cercana proximidad de las MGC a los adipocitos podría desencadenar este fenotipo espumoso característico de las células Touton. Un aumento de la cantidad o densidad de un fenotipo específico podría asociarse con daño tisular o con la intensidad de la inflamación. Sin embargo, un incremento de la actividad fagocítica de estas células podría también asociarse con la destrucción de la arquitectura normal de la articulación. En ese sentido, el contenido fisiológico de la membrana sinovial podría ser reabsorbido por MGC especializadas de la misma manera que el hueso es absorbido por los osteoclastos. De hecho, se ha relacionado la presencia de MGC con la resorción activa del hueso en la sinovial de conejos con artritis crónica [154].

Por lo tanto, las MGC se diferencian, desde monocitos a macrófagos durante los procesos inflamatorios crónicos con el objetivo de eliminar material de desecho del propio tejido [135]. En este sentido habría una relación entre la intensidad de la respuesta inflamatoria sinovial y la presencia de MGC. Un elevado porcentaje de sinoviales AR presentaba MGC, estando su densidad asociada con la intensidad de la sinovitis. En relación a las biopsias sinoviales OA, solamente se encontró una escasa representación de MGC en OANI, mientras que estas células se identificaron, al menos,

en la mitad de las muestras OAI. Aunque los pacientes con AR y con OA mostraron un incremento significativo de las concentraciones de CRP en suero, no se encontró asociación alguna con el contenido en MGC. No obstante, para evaluar este dato, hay que tener presente que una sola determinación de la CRP no es representativa del grado de inflamación acumulado a lo largo de todo el curso de la enfermedad, más aún en pacientes terapéuticamente bien controlados. En lo que respecta la sinovitis OA, inesperadamente presentó una gran cantidad de MGC. A pesar de que en esta enfermedad la intensidad de la respuesta inflamatoria es sustancialmente inferior a la presente en la AR [71], la sinovial OA contiene en ocasiones un infiltrado inflamatorio masivo, que comparte características histológicas con la AR. De hecho, la sinovial OAI mostró un grado de sinovitis de tipo reumatoide, como se ha observado previamente en otros estudios [77,158], y a su vez, algunos casos de OAI mostraron una densidad de MGC similar a la observada en AR. Este hallazgo encontrado en otra enfermedad articular como es la OA respalda la conclusión que la presencia de MGC podría considerarse un marcador histopatológico de intensidad inflamatoria.

Asimismo, la presencia de FBGC y LGC en la sinovial reumatoide y artrósica están en línea con datos publicados anteriormente [99]. Los fragmentos de cartílago pueden encontrarse dentro de la sinovial rodeados por MGC típicas de reacciones a cuerpo extraño [24]. Se ha demostrado que las morfologías de tipo FBGC y de tipo LGC surgen bajo la influencia de citocinas muy distintas. Se puede inducir la formación de FBGC *in vitro* mediante estimulación con IL-4, IL-13 y α -tocopherol. Alternativamente, la generación de LGC *in vitro* está mediada por el IFN- γ más un factor promotor de la maduración macrofágica [80,134]. Es bien sabido que gran variedad de células inmunes del tejido sinovial producen IL-4 y el IFN- γ [182], por lo que la presencia de diferentes fenotipos de MGC en AR y en OA podría vincularse con las concentraciones de distintas citocinas y factores de crecimiento.

Para diferenciar las FBGC de las MGC de tipo osteoclasto, se realizaron tinciones de marcadores específicos de osteoclasto para caracterizar la presencia de este tipo concreto de MGC en las biopsias sinoviales. Como se esperaba, algunas MGC, con una organización aleatoria nuclear, se tiñeron positivamente para TRAP, mientras que las de tipo Langhans no lo hicieron, siendo negativas para este marcador. Se

detectaron células mononucleares de la capa íntima teñidas positivamente en AR y en OA, sin embargo, no se encontraron MGC positivas para catepsina K en las biopsias sinoviales. Estas células solamente se identificaron en el pannus adyacente a la superficie del hueso. Estudios previos han descrito la expresión génica de catepsina K en el tejido sinovial AR y OA. Datos recientes también han demostrado la tinción positiva de MGC para catepsina K en la membrana sinovial, aunque la proximidad del hueso en esas muestras no fue descartada por los autores [49,50,83]. Nuestros resultados contrastan con datos previos que describen la tinción positiva para catepsina K y para TRAP como una característica general de las MGC, no obstante, otros estudios demuestran la presencia de MGC teñidas negativamente para catepsina K en carcinoma de pecho [173] y en biopsias de pulmón [145].

2. El RANKL sintetizado por los condrocitos articulares contribuye a la pérdida de hueso yuxta-articular en la artritis crónica

La expresión del RANKL y de la OPG se encontró más elevada en el cartílago articular de conejos AIA en comparación con la de conejos sanos. El patrón de distribución del RANKL también mostró ser diferente en el cartílago de conejos AIA y sanos. Se detectó una señal intensa del RANKL intracelular y extracelular en el cartílago de conejos AIA, especialmente en el cartílago calcificado cerca de estructuras vasculares, mientras que en la misma área del cartílago sano su expresión fue leve e intracelular, pero no extracelular. Además, la señal resortiva medida por el ratio RANKL/OPG estaba incrementada en el cartílago articular de conejos AIA y este aumento mostró ser simultáneo a una pérdida ósea en la placa subcondral que se mantenía homogénea a lo largo del cóndilo femoral.

La pérdida ósea sistémica en la AR es una alteración compleja y multifactorial en la que la inflamación crónica juega un importante papel. Dentro de la articulación, las erosiones óseas focales y la pérdida ósea yuxta-articular pueden observarse en distintas localizaciones. Las erosiones del hueso focales se observan con frecuencia en las zonas marginales donde el pannus invade el hueso cortical, mientras que la pérdida

de hueso yuxta-articular ocurre en el hueso subcondral trabecular [195]. El que esas localizaciones se relacionen con distintos mecanismos moleculares está aún por conocer. Sin embargo, está bastante aceptado que existe un contacto directo entre el hueso y la sinovial en aquellos sitios dónde se han descrito erosiones del hueso focales. Los procesos de pérdida de hueso se deben principalmente a un incremento del número de osteoclastos [162], hecho regulado por el sistema RANK/RANKL/OPG [150]. En la sinovial inflamada de pacientes con AR los niveles de RANKL están aumentados [45,66,172]. Además, la expresión sinovial del RANKL se localiza principalmente en las áreas focales de pannus dónde se ha observado invasión del hueso subcondral [151], y su localización coincide con los sitios dónde se han identificado células precursoras de osteoclastos. Por tanto, el RANKL es capaz de diferenciar células mononucleares a osteoclastos activados en las áreas de erosión ósea. Estos datos sugieren que el RANKL producido por las células sinoviales contribuye a la formación de erosiones de la AR.

Según los resultados obtenidos en este estudio, la pérdida de hueso subcondral en los conejos AIA no quedaba restringida a las áreas de contacto directo entre el hueso y el pannus. De hecho, la pérdida de hueso subcondral se mantenía uniforme a lo largo de la placa subcondral en el grupo AIA, siendo similar en los márgenes de la interfaz hueso-pannus y en las regiones de carga. Por lo que se puede especular que la membrana sinovial no sería el único factor responsable de este tipo de lesión específica. Dentro de la articulación los condrocitos también son capaces de sintetizar RANKL [139], sin embargo, no se ha prestado suficiente atención a su posible potencial en las alteraciones del hueso subcondral relacionadas con la AR. Según estas observaciones, se plantea la posibilidad de que el RANKL sintetizado en el cartílago articular, un tejido íntimamente próximo a la superficie del hueso, pudiera tener un efecto paracrino que modulase el remodelado del hueso subcondral en el progreso de la AR. A pesar de que se ha descrito que la membrana sinovial es la fuente principal de RANKL, se ha observado que en conejos AIA, el RANKL sintetizado por el cartílago articular alcanza un tercio de la cantidad total producida por los tres tejidos articulares. Se ha encontrado que el ratio RANKL / OPG es similar en hueso y membrana sinovial, lo que sugiere que ambos tejidos expresan una potente señal resortiva similar.

También se ha demostrado que la expresión del RANKL en el grupo AIA estaba incrementada en relación al cartílago sano y OA, y notablemente el aumento de la proporción del ratio RANKL / OPG en el cartílago de conejos AIA ocurría simultáneamente a la pérdida de hueso subcondral. Por otra parte, los conejos con la pérdida de hueso subcondral menor, como los conejos OA, también mostraron una señal resortiva menor en el cartílago. Aunque la expresión del RANKL aumenta con el grado de inflamación sinovial en las regiones de pannus asociado a hueso, la relación RANKL / OPG se mantuvo similar en los tres grupos de conejos.

Se desconoce si el efecto del RANKL en los condrocitos podría estar mediado por su receptor RANK. Por otro lado, varios estudios sugieren que el RANKL tendría un efecto paracrino sobre el hueso subcondral [25,191,202]. Se ha observado que el aumento de la expresión del RANKL en el cartílago de conejos AIA estaba vinculado con la presencia extracelular del RANKL en el cartílago calcificado de estos conejos. Resultados previos de nuestro grupo han demostrado también que el RANKL se localiza en la matriz extracelular del cartílago OA humano, pudiendo alcanzar el hueso subcondral a través del cartílago calcificado. Estos resultados señalan que el RANKL sintetizado por los condrocitos puede actuar sobre las células óseas estimulando la pérdida de hueso yuxta-articular. Estos resultados representan una confirmación *in vivo* de resultados previamente publicados que afirman que el cartílago calcificado es una capa permeable que permite el transporte o difusión de solutos de un peso molecular no mayor de 376 kDa [40,88]. Nuestras observaciones también están en consonancia con datos previamente descritos que demuestran que el RANKL soluble producido por los condrocitos hipertróficos es una molécula biológicamente activa durante el crecimiento óseo que actúa de una manera paracrina en la placa ósea subcondral [143].

Se ha descrito que el tratamiento de la AR con corticoesteroides [126] o metotrexato regula la pérdida de hueso, modulando la expresión sinovial del RANKL [75]. En este contexto, nuestros resultados sugieren que sería conveniente estudiar si estos agentes farmacológicos u otros fármacos anti-inflamatorios también pudiesen prevenir la pérdida ósea relacionada con la AR por la inhibición de la expresión de RANKL en el cartílago.

3. La hipercolesterolemia incrementa la destrucción articular en la artritis crónica. Modelo experimental agravado por la infiltración de células espumosas

Hasta donde sabemos somos el primer grupo que muestra que la hipercolesterolemia incrementa la progresión de la artritis crónica, al menos en nuestro modelo de artritis crónica en conejos. Este es un modelo novedoso de artritis crónica agravado por la hipercolesterolemia e impulsado por MΦ con un fenotipo agresivo. Estos MΦ dañan notablemente la membrana sinovial, el cartílago calcificado, el hueso yuxta-articular y el tejido adiposo; además aumentan el angiogénesis sinovial. Hemos encontrado un modesto pero evidente incremento del infiltrado celular sinovial en conejos no artríticos alimentados con dieta hiperlipidémica. Se ha descrito que donantes de sangre con un perfil aterogénico y lipídico caracterizado por altos niveles de colesterol, triglicéridos y apo B, así como bajos niveles de HDL desarrollaron posteriormente AR [70]. Igualmente, se ha observado un mayor riesgo de padecer AR en pacientes con MetS [92]. Estudios recientes de obesidad apoyan estos hallazgos desde que el perfil lipídico pudiera estar también influenciado por el índice de masa corporal. La obesidad se ha asociado con un riesgo modesto a desarrollar AR, pero el rápido incremento de la prevalencia de la obesidad podría ser responsable de la elevada incidencia en AR [46]. Además, la obesidad se ha relacionado con el empeoramiento del desenlace de la enfermedad, una alta prevalencia de morbilidad y un pobre efecto terapéutico de glucocorticoides, fármacos anti-reumáticos modificadores de la enfermedad y agentes biológicos [3,68,96]. Todos estos hallazgos sugieren que la hiperlipidemia podría influenciar la iniciación y progreso de la sinovitis crónica.

Dado que no existen estudios claros que demuestran que la hipercolesterolemia incrementa la sinovitis crónica, investigar el efecto hipolipidémico de las estatinas aportaría información adicional en esta relación. Entre sus conocidos efectos beneficiosos sobre el metabolismo lipídico en pacientes con elevados niveles de colesterol y enfermedades cardiovasculares e inflamatorias [11,132,144], las estatinas han demostrado tener unos efectos anti-inflamatorios, antioxidantes,

inmunomoduladores y anti-trombóticos [118]. Así, en un ensayo clínico de 6 meses de duración se demostró una mejoría significativa en la clínica de pacientes con AR tratados con atorvastatina. Otro estudio reciente en una cohorte numerosa de pacientes ha mostrado una asociación entre la buena aceptación del tratamiento con estatinas y el riesgo reducido a desarrollar AR [38]. Las estatinas reducen el riesgo de desarrollar AR entre un 30-40%, mientras que otros fármacos hipolipemiantes distintos de las estatinas no parecen estar asociados con un riesgo menor [90]. Por lo tanto, las estatinas podrían considerarse protectoras contra el desarrollo y progreso de la AR en aquellos pacientes con hiperlipidemia.

Un infiltrado masivo de MΦ RAM-11 positivos, un mayor número de células multinucleadas y la presencia de células espumosas fueron las observaciones características de la membrana sinovial de conejos AIA+HFD. Se ha descrito previamente en un modelo combinado de artritis crónica y arteriosclerosis la activación de células sanguíneas mononucleares por el incremento en la transcripción del NFκB y por un infiltrado masivo de MΦ en la placa arteriosclerótica [110]. En conjunto, estos hallazgos junto con la internalización de lípidos por las células mononucleares en sangre periférica sugieren que estas células podrían conducir a la inflamación sistémica produciendo un enorme infiltrado de macrófagos, lo que explicaría la sinovitis agresiva observada en este modelo experimental. De acuerdo con esto, varios estudios inmunohistológicos han destacado la implicación de los MΦ en la intensificación de la respuesta inflamatoria. El número de MΦ estaba incrementado en articulaciones clínicamente afectadas en comparación con articulaciones sanas [102], y se correlacionó bien con los síntomas clínicos de la actividad de la enfermedad, como dolor e hinchazón [186]. El cambio en el número de MΦ de la capa subíntima se ha propuesto como un biomarcador sensible para predecir la posible eficacia de nuevos tratamientos anti-reumáticos[72].

La alta y versátil plasticidad de los MΦ, como muestra la marcada transformación de MΦ en células espumosas, en células multinucleadas que fagocitan lípidos y más adelante en osteoclastos teñidos positivamente para catepsina K, ha sido uno de los hallazgos más relevantes en este modelo experimental combinado con una dieta hipercolesterolémica. Se han identificado MΦ envolviendo y rodeando

adipocitos en el tejido adiposo de ratones obesos y humanos [141], lo que demuestra una fagocitosis exacerbada de células adiposas por MΦ activados en la subíntima sinovial de conejos AIA+HFD. La incrementada transformación de MΦ en células espumosas en las capas íntima y subíntima de los conejos AIA+HFD se produce como resultado de una absorción mejorada por los receptores depuradores de oxLDL. Una ruptura del equilibrio transcripcional mediada por los sensores de lípidos entre el metabolismo lipídico y las funciones inmunes en los MΦ promueve la liberación de señales pro-inflamatorias durante su activación, y, finalmente, conduce a la formación de células espumosas. Un desequilibrio persistente entre los mediadores pro y anti-inflamatorios liberados por los MΦ y una eliminación insuficiente de células apoptóticas podrían mantener la inflamación crónica [51]. De hecho, los MΦ de animales experimentales producen niveles significativos de TNF- α y potencialmente otros mediadores como la IL-6 que podrían inducir la expresión de la CRP [110].

El crecimiento de la membrana sinovial se acompañaba de neovascularización, como demostraba el aumento de los vasos teñidos positivamente para CD31 en los conejos AIA+HFD los MΦ promueven la angiogénesis por la producción de factores angiogénicos que incluyen citocinas pro-inflamatorias, factores de crecimiento y quimiocinas que a su vez fomentan la adhesión celular endotelial, receptores de adhesión y la neovascularización [185]. Muchas de estas moléculas no se indujeron en los MΦ de tejido adiposo de ratones *Knock out* para CCR2 alimentados con una dieta enriquecida en grasa, apoyando la importancia de CCR2 en la regulación del reclutamiento de MΦ pro-inflamatorios durante la obesidad [121]. El tratamiento de la AR con anticuerpos anti-TNF- α reduce los niveles de factores pro-angiogénicos, como el VEGF, conduciendo a la normalización de la vascularización. También se ha sugerido que la leptina puede inducir angiogénesis en la osificación endocondral [107]. Estos datos enfatizan la estrecha relación entre la angiogénesis, la inflamación y la obesidad de la enfermedad. En este modelo animal, aún queda por establecer si la hipercolesterolemia favorece y potencia la angiogénesis en la membrana sinovial de conejos artríticos por lo que se está realizando experimentación adicional que lo confirme.

La transformación fenotípica de MΦ a osteoclastos positivos para catepsina K en conejos AIA y sobre todo en AIA+HFD refleja el desarrollo de osteoclastos a partir de células precursoras del linaje monocito/macrófago, una de las características únicas de la AR [112]. La catepsina K es la principal proteasa de los osteoclastos responsable de la resorción del hueso y su producto de degradación específico, el telopéptido C-terminal de colágeno tipo I (CTX-I), se ha utilizado ampliamente como marcador de la resorción ósea [12,37,204]. Por tanto, la resorción ósea activa encontrada en la sinovial de conejos AIA+HFD muestra la influencia de la hiperlipidemia en el metabolismo óseo. De hecho, se ha descrito la producción de fragmentos CTX-I por MΦ humanos de tipo espumoso en la placa arteriosclerótica [178,189]. Múltiples parámetros de la calidad ósea se encontraron alterados, entre ellos la BMD o el número de trabéculas, junto con cambios de las propiedades mecánicas del hueso y un incremento de los osteoclastos residentes en un modelo de ratón combinado con dieta hipercolesterolémica [147]. Pese a que la puntuación global de sinovitis y la expresión de niveles de RANKL y TNF- α eran similares en los conejos AIA y AIA+HFD, la actividad resortiva estaba notablemente incrementada en el grupo AIA+HFD, lo que sugiere una mayor actividad o eficiencia del RANKL en presencia de altos niveles de LDL. Se ha descrito recientemente que la deficiencia en LDL provoca una alteración de la osteoclastogénesis con la consiguiente disminución de parámetros de la resorción ósea y un incremento de la masa ósea en ratones debido a un defecto en la fusión osteoclástica [142]. Además, se ha visto que las señales mediadoras de la vía Wnt podrían alterarse en condiciones de hiperlipidemia con la consecuente alteración de la resorción del hueso[125].

VI. Conclusiones

1. We have observed that MGC are highly present in the synovia of RA and inflammatory OA people.
2. MGC in OA synovitis displayed a predominant Langhans phenotype while both Langhans and Foreign body types were equally abundant in rheumatoid synovium. Particularly, Langhans phenotype was not immunoreactive for TRAP.
3. MGC have been associated with local inflammation rather than with systemic inflammation
4. According to their precise synovial location, MGC subtypes may be associated with specific detritus targets probably stimulating its differentiation and triggering its participation in the destruction of the synovium architecture.
5. Articular chondrocytes may contribute to the differentiation of mononuclear cells to osteoclasts by the release of RANKL.
6. Pathological changes in the expression and localization of RANKL synthesized by articular chondrocytes might be also involved in juxta-articular bone loss. We suggest a new pathological mechanism underlying the juxta-articular bone loss associated with chronic arthritis.
7. We have successfully developed a model of chronic arthritis aggravated by hypercholesterolemia and driven by foam macrophages with an aggressive phenotype that markedly damages synovial membrane, juxta-articular bone and fat tissue.
8. The experimental model of chronic arthritis combined with a high fat diet permitted the identification of similar MGC subtypes identified in RA and OA synovitis. An association with specific detritus targets apparently stimulating its differentiation was also observed.

VII. Bibliografía

- 1 Abramson SB, Attur M. Developments in the scientific understanding of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2009;11:227.
- 2 Aigner T, Schmitz N. Pathogenesis and pathology of osteoarthritis. In: *Rheumatology 5th edition*. Philadelphia. 2011: 1741–59.
- 3 Ajeganova S, Andersson ML, Hafström I. Association of obesity with worse disease severity in rheumatoid arthritis as well as with comorbidities: a long-term followup from disease onset. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2013;65:78–87.
- 4 Al-Arfaj AS. Radiographic osteoarthritis and serum cholesterol. *Saudi Med J* 2003;24:745–7.
- 5 Alipour A, van Oostrom AJHHM, Izraeljan A, Verseyden C, Collins JM, Frayn KN, Plokker TWM, Elte JWF, Castro Cabezas M. Leukocyte activation by triglyceride-rich lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:792–7.
- 6 Al-saffar N, Revel PA. Differential Expression of Transforming Growth Factor- α and Macrophage Colony-Stimulating Factor / Colony-Stimulating Factor-1R (c-fms) by Multinucleated Giant Cells Involved in Pathological Bone Resorption at the Site of Orthopaedic Implants. *J Orthop Res* 2000;18:800–7.
- 7 Anderson JM. Multinucleated giant cells. *Curr Opin Hematol* 2000;7:40–7.
- 8 Aterman K, Remmele W, Smith M. Karl Touton and His “Xanthelasmatic Giant Cell” A Selective Review of Multinucleated Giants Cells. *Am J Dermatopathol* 1988;10:257–69.
- 9 Athanasou NA. Synovial macrophages. *Ann Rheum Dis* 1995;54:392–4.
- 10 Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:669–92.

- 11 Baigent C, Keech a, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, Kirby a, Sourjina T, Peto R, Collins R, Simes R. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 2005;366:1267–78.
- 12 Barascuk N, Skjøt-Arkil H, Register TC, Larsen L, Byrjalsen I, Christiansen C, Karsdal MA. Human macrophage foam cells degrade atherosclerotic plaques through cathepsin K mediated processes. *BMC Cardiovasc Disord* 2010;10:19.
- 13 Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 2010;233:233–55.
- 14 Beffa C Della, Slansky E, Pommerenke C, Klawonn F, Li J, Dai L, Schumacher HR, Pessler F. The relative composition of the inflammatory infiltrate as an additional tool for synovial tissue classification. *PLoS One* 2013;8:e72494.
- 15 Bellido M, Lugo L, Roman-Blas JA, Castañeda S, Caeiro JR, Dapia S, Calvo E, Largo R, Herrero-Beaumont G. Subchondral bone microstructural damage by increased remodelling aggravates experimental osteoarthritis preceded by osteoporosis. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R152.
- 16 Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (Osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis Cartilage* 2013;21:16–21.
- 17 Van den Berg WB, Van Lent PL. The Role of Macrophages in Chronic Arthritis. *Immunobiology* 1996;195:614–23.
- 18 Berry PA, Maciewicz RA, Cicuttini FM, Jones MD, Hellawell CJ, Wluka AE. Markers of bone formation and resorption identify subgroups of patients with clinical knee osteoarthritis who have reduced rates of cartilage loss. *J Rheumatol* 2010;37:1252–9.
- 19 Bhan AK, Roy S. Synovial giant cells in rheumatoid arthritis and other joint diseases. *Ann rheum Dis* 1971;30:294–8.

-
- 20 Blom AB, Van Lent PLEM, Holthuysen AEM, van der Kraan PM, Roth J, van Rooijen N, van den Berg WB. Synovial lining macrophages mediate osteophyte formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12:627–35.
 - 21 Bondeson J, Blom AB, Wainwright S, Hughes C, Caterson B, van den Berg WB. The role of synovial macrophages and macrophage-produced mediators in driving inflammatory and destructive responses in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:647–57.
 - 22 Bondeson J. Activated Synovial Macrophages as Targets for Osteoarthritis Drug Therapy. *Curr Drug Targets* 2010;11:576–85.
 - 23 Bonet M, Granados N, Palou A. Molecular Players at the Intersection of Obesity and Osteoarthritis. *Curr Drug Targets* 2011;12:2103–28.
 - 24 Bonnet C, Walsh D. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:7–16.
 - 25 Botter SM, van Osch GJVM, Clockaerts S, Waarsing JH, Weinans H, van Leeuwen JPTM. Osteoarthritis induction leads to early and temporal subchondral plate porosity in the tibial plateau of mice: An in vivo micro CT study. *Arthritis Rheum* 2011;63:2690–9.
 - 26 Boulocher CB, Viguier ER, Cararo RDR, Fau DJ, Arnault F, Collard F, Maitre PA, Roualdes O, Duclos M-E, Vignon EP, Roger TW. Radiographic assessment of the femorotibial joint of the CCLT rabbit experimental model of osteoarthritis. *BMC Med Imaging* 2010;10:3.
 - 27 Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423:337–42.

- 28 Braun T, Zwerina J. Positive regulators of osteoclastogenesis and bone resorption in rheumatoid arthritis IL-17 IL-15 M-CSF IL-34. *Cytokines* 2011;13:235.
- 29 Brodbeck WG, Anderson JM. Giant cell formation and function. *Curr Opin Hematol* 2009;16:53–7.
- 30 Calvo E, Castañeda S, Largo R, Fernández-Valle ME, Rodríguez-Salvanés F, Herrero-Beaumont G. Osteoporosis increases the severity of cartilage damage in an experimental model of osteoarthritis in rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:69–77.
- 31 Carmona L, Ballina J, Gabriel R, Laffon A. The burden of musculoskeletal diseases in the general population of Spain: results from a national survey. *Ann Rheum Dis* 2001;60:1040–5.
- 32 Carmona L, Villaverde V, Hernández-García C, Ballina J, Gabriel R, Laffon A. The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain. *Rheumatology (Oxford)* 2002;41:88–95.
- 33 Castañeda S, Largo R, Calvo E, Rodríguez-Salvanés F, Marcos ME, Díaz-Curiel M, Herrero-Beaumont G. Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits. *Skeletal Radiol* 2006;35:34–41.
- 34 Castañeda S, Roman-Blas JA, Largo R, Herrero-Beaumont G. Osteoarthritis: a progressive disease with changing phenotypes. *Rheumatology (Oxford)* 2014;53:1–3.
- 35 Castañeda S, Roman-Blas JA, Largo R, Herrero-Beaumont G. Subchondral bone as a key target for osteoarthritis treatment. *Biochem Pharmacol* 2012;83:315–23.
- 36 Chambers TJ. The birth of the osteoclast. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1192:19–26.

- 37 Chase J. Role of Nuclear Factor-kappaB Activation in Metalloproteinase-1, -3, and -9 Secretion by Human Macrophages In Vitro and Rabbit Foam Cells Produced In Vivo. *Arter Thromb Vasc Biol* 2002;22:765–71.
- 38 Chodick G, Amital H, Shalem Y, Kokia E, Heymann AD, Porath A, Shalev V. Persistence with statins and onset of rheumatoid arthritis: a population-based cohort study. *PLoS Med* 2010;7:e1000336.
- 39 Choy E, Panayi G. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2001;344:907–16.
- 40 Clark JM. The structure of vascular channels in the subchondral plate. *J Anat* 1990;171:105–15.
- 41 Clemmensen I, Hølund B, Andersen R. Fibrin and fibronectin in rheumatoid synovial membrane and rheumatoid synovial fluid. *Arthritis Rheum* 1983;26:479–85.
- 42 Cohen R, Scott D, Erb H. Prevalence, number and morphological types of multinucleated histiocytic giant cells in equine inflammatory dermatoses: a retrospective light microscopic study of skin-biopsy specimens from 362 horses. *EQUINE Vet J* 2009;41:406–9.
- 43 Consolaro A, Sant’Ana E, Lawall MA, Consolaro MFMO, Bacchi CE. Gingival juvenile xanthogranuloma in an adult patient: case report with immunohistochemical analysis and literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:246–52.
- 44 Crockett JC, Rogers MJ, Coxon FP, Hocking LJ, Helfrich MH. Bone remodelling at a glance. *J Cell Sci* 2011;124:991–8.
- 45 Crotti TN, Smith MD, Weedon H, Ahern MJ, Findlay DM, Kraan M, Tak PP, Haynes DR. Receptor activator NF-kappaB ligand (RANKL) expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathy,

- osteoarthritis, and from normal patients: semiquantitative and quantitative analysis. *Ann Rheum Dis* 2002;61:1047–54.
- 46 Crowson CS, Matteson EL, Davis JM, Gabriel SE. Contribution of obesity to the rise in incidence of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2013;65:71–7.
- 47 Crowther M. Pathogenesis of atherosclerosis. *Hematology* 2005;2005:436–41.
- 48 DiCesare P, Haudenschild D, Samuels J, Abramson S. Pathogenesis of osteoarthritis. In: *Kelley's Textbook of Rheumatology, 9th edition*, Philadelphia. 2013: 1617–35.
- 49 Dodds RA, Connor JR, Drake FH, Gowen M. Expression of cathepsin K messenger RNA in giant cells and their precursors in human osteoarthritic synovial tissues. *Arthritis Rheum* 1999;42:1588–93.
- 50 Dodds RA, James I, Rieman D, Ahern R, Hwang SM, Connor JR, Thompson SD, Veber DF, Drake FH, Holmes S, Lark MW, Gowen M. Human Osteoclast Cathepsin K Is Processed Intracellularly. *J Bone Miner Res* 2001;16:478–86.
- 51 Dushkin MI. Macrophage/Foam cell is an attribute of inflammation: mechanisms of formation and functional role. *Biochem* 2012;77:327–38.
- 52 Fan JL, Yamada T, Tokunaga O, Watanabe T. Alterations in the functional characteristics of macrophages induced by hypercholesterolemia. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1991;61:19–27.
- 53 Fernandez-Lopez JC, Laffon A, Blanco FJ, Carmona L. Prevalence, risk factors, and impact of knee pain suggesting osteoarthritis in Spain. *Clin Exp Rheumatol* 2008;26:324–32.
- 54 Ferraz-Amaro I, González-Juanatey C, López-Mejías R, Riancho-Zarrabeitia L, González-Gay M a. Metabolic syndrome in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm* 2013;2013:710928.

-
- 55 Finzel S, Rech J, Schmidt S, Engelke K, Englbrecht M, Schett G. Interleukin-6 receptor blockade induces limited repair of bone erosions in rheumatoid arthritis: a micro CT study. *Ann Rheum Dis* 2013;72:396–400.
- 56 Firestein GS. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: *Kelley's Textbook of Rheumatology, 9th edition*. Philadelphia. 2013: 1059–108.
- 57 Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003;423:356–61.
- 58 Funck-Brentano T, Cohen-Solal M. Crosstalk between cartilage and bone: when bone cytokines matter. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011;22:91–7.
- 59 Furuzawa-Carballeda J, Macip-Rodríguez P, Cabral A. Osteoarthritis and rheumatoid arthritis pannus have similar qualitative metabolic characteristics and pro-inflammatory cytokine response. *Clin Exp Rheumatol* 2008;26:554–60.
- 60 Goldring M, Otero M. Inflammation in Osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2011;23:471–8.
- 61 Goldring SR, Gravallese EM. Mechanisms of bone loss in inflammatory arthritis: diagnosis and therapeutic implications. *Arthritis Res* 2000;2:33–7.
- 62 Gómez-Mateo MDC, Monteagudo C. Nonepithelial skin tumors with multinucleated giant cells. *Semin Diagn Pathol* 2013;30:58–72.
- 63 Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005;5:953–64.
- 64 Gower RM, Wu H, Foster G a, Devaraj S, Jialal I, Ballantyne CM, Knowlton A a, Simon SI. CD11c/CD18 expression is upregulated on blood monocytes during hypertriglyceridemia and enhances adhesion to vascular cell adhesion molecule-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:160–6.

-
- 65 Gravallesse EM, Harada Y, Wang JT, Gorn a H, Thornhill TS, Goldring SR. Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 1998;152:943–51.
- 66 Gravallesse EM, Manning C, Tsay A, Naito A, Pan C, Amento E, Goldring SR. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum* 2000;43:250–8.
- 67 Gravallesse EM, Monach P. The rheumatoid joint: synovitis and tissue destruction. In: *Rheumatology 5th ed*. Philadelphia. 2011: 911–34.
- 68 Gremese E, Carletto A, Padovan M, Atzeni F, Raffener B, Giardina AR, Favalli EG, Erre GL, Gorla R, Galeazzi M, Foti R, Cantini F, Salvarani C, Olivieri I, Lapadula G, Ferraccioli G. Obesity and reduction of the response rate to anti-tumor necrosis factor α in rheumatoid arthritis: an approach to a personalized medicine. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2013;65:94–100.
- 69 Grimley P, Sokoloff L. Synovial giant cells in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 1966;49:931–54.
- 70 Van Halm VP, Nielen MMJ, Nurmohamed MT, van Schaardenburg D, Reesink HW, Voskuyl a E, Twisk JWR, van de Stadt RJ, de Koning MHMT, Habibuw MR, van der Horst-Bruinsma IE, Dijkmans B a C. Lipids and inflammation: serial measurements of the lipid profile of blood donors who later developed rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66:184–8.
- 71 Haraoui B, Pelletier JP, Cloutier JM, Faure MP, Martel-Pelletier J. Synovial membrane histology and immunopathology in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. In vivo effects of antirheumatic drugs. *Arthritis Rheum* 1991;34:153–63.
- 72 Haringman JJ, Gerlag DM, Zwinderman a H, Smeets TJM, Kraan MC, Baeten D, McInnes IB, Bresnihan B, Tak PP. Synovial tissue macrophages: a sensitive

- biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:834–8.
- 73 Hart DJ, Doyle DV, Spector TD. Association between metabolic factors and knee osteoarthritis in women: the Chingford Study. *J Rheumatol* 1995;22:1118–23.
- 74 Haseeb A, Haqqi TM. Immunopathogenesis of osteoarthritis. *Clin Immunol* 2013;146:185–96.
- 75 Haynes D, Crotti T, Weedon H, Slavotinek J, Au V, Coleman M, Roberts-Thomson PJ, Ahern M, Smith MD. Modulation of RANKL and osteoprotegerin expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis in response to disease-modifying antirheumatic drug treatment and correlation with radiologic outcome. *Arthritis Rheum* 2008;59:911–20.
- 76 Haynes DR. Inflammatory cells and bone loss in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2007;9:104.
- 77 Haynes MK, Hume EL, Smith JB. Phenotypic Characterization of Inflammatory Cells from Osteoarthritic Synovium and Synovial Fluids. *Clin Immunol* 2002;105:315–25.
- 78 Haywood L, McWilliams DF, Pearson CI, Gill SE, Ganesan A, Wilson D, Walsh DA. Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:2173–7.
- 79 Heine GH, Ortiz A, Massy Z a, Lindholm B, Wiecek A, Martínez-Castelao A, Covic A, Goldsmith D, Süleymanlar G, London GM, Parati G, Sicari R, Zoccali C, Fliser D. Monocyte subpopulations and cardiovascular risk in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2012;8:362–9.
- 80 Helming L, Gordon S. The molecular basis of macrophage fusion. *Immunobiology* 2007;212:785–93.

- 81 Herrero-Beaumont G, Roman-Blas JA, Castañeda S, Jimenez SA. Primary osteoarthritis no longer primary: three subsets with distinct etiological, clinical, and therapeutic characteristics. *Semin Arthritis Rheum* 2009;39:71–80.
- 82 Horwood NJ, Kartsogiannis V, Quinn JM, Romas E, Martin TJ, Gillespie MT. Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;265:144–50.
- 83 Hou W-S, Li W, Keyszer G, Weber E, Levy R, Klein MJ, Gravallese EM, Goldring SR, Brömme D. Comparison of cathepsins K and S expression within the rheumatoid and osteoarthritic synovium. *Arthritis Rheum* 2002;46:663–74.
- 84 Hume DA, Ross IL, Himes SR, Sasmono RT, Wells CA, Ravasi T. The mononuclear phagocyte system revisited. *J Leukoc Biol* 2002;72:621–7.
- 85 Hume DA. The mononuclear phagocyte system. *Curr Opin Immunol* 2006;18:49–53.
- 86 Hummel KM, Petrow PK, Franz JK, Müller-Ladner U, Aicher WK, Gay RE, Brömme D, Gay S. Cysteine proteinase cathepsin K mRNA is expressed in synovium of patients with rheumatoid arthritis and is detected at sites of synovial bone destruction. *J Rheumatol* 1998;25:1887–94.
- 87 Ikeda T, Kasai M, Suzuki J, Kuroyama H, Seki S, Utsuyama M, Hirokawa K. Multimerization of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) isoforms and regulation of osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2003;278:47217–22.
- 88 Imhof H, Sulzbacher I, Grampp S, Czerny C, Youssefzadeh S, Kainberger F. Subchondral Bone and Cartilage Disease A rediscovered Functional Unit. *Invest Radiol* 2000;35:581–8.
- 89 Jansen IDC, Vermeer JAF, Bloemen V, Stap J, Everts V. Osteoclast Fusion and Fission. *Calcif Tissue Int* 2012;90:515–22.

-
- 90 Jick SS, Choi H, Li L, McInnes IB, Sattar N. Hyperlipidaemia, statin use and the risk of developing rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;68:546–51.
- 91 Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ, Thomas RJ, Hards DK, Quinn JM, Niforas P, Ng KW, Martin TJ, Gillespie MT. Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone* 1999;25:525–34.
- 92 Karvounaris SA, Sidiropoulos PI, Papadakis JA, Spanakis EK, Bertias GK, Kritikos HD, Ganotakis ES, Boumpas DT. Metabolic syndrome is common among middle-to-older aged Mediterranean patients with rheumatoid arthritis and correlates with disease activity: a retrospective, cross-sectional, controlled, study. *Ann Rheum Dis* 2007;66:28–33.
- 93 Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, Morita Y, Okamoto A, Kawashima M, Iwahashi M, Ueno A, Ohmoto Y, Makino H. CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:2578–86.
- 94 Kinne R, Bräuer R, Stuhlmüller B, Palombo-Kinne E, Burmester G. Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2000;2:189–202.
- 95 Kinne RW, Stuhlmüller B, Burmester G-R. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Macrophages. *Arthritis Res Ther* 2007;9:224.
- 96 Klaasen R, Wijbrandts C, Gerlag DM, Tak PP. Body mass index and clinical response to infliximab in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2011;63:359–64.
- 97 Knowles HJ, Athanasou NA. Canonical and non-canonical pathways of osteoclast formation. *Histol Histopathol* 2009;24:337–46.
- 98 Knowles HJ, Moskovsky L, Thompson MS, Grunhen J, Cheng X, Kashima TG, Athanasou N a. Chondroclasts are mature osteoclasts which are capable of cartilage matrix resorption. *Virchows Arch* 2012;461:205–10.

-
- 99 Koizumi F, Matsuno H, Wakaki K, Ishii Y, Kurashige Y, Nakamura H. Synovitis in rheumatoid arthritis: scoring of characteristic histopathological features. *Pathol Int* 1999;49:298–304.
- 100 Komuro H, Olee T, Kühn K, Quach J, Brinson DC, Shikhman A, Valbracht J, Creighton-Achermann L, Lotz M. The osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor kappaB/receptor activator of nuclear factor kappaB ligand system in cartilage. *Arthritis Rheum* 2001;44:2768–76.
- 101 Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999;402:304–9.
- 102 Kraan MC, Versendaal H, Jonker M, Bresnihan B, Post WJ, Hart BA, Breedveld FC, Tak PP. Asymptomatic synovitis precedes clinically manifest arthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:1481–8.
- 103 Van der Kraan PM, van den Berg WB. Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthritis Cartilage* 2012;20:223–32.
- 104 Krenn V, Morawietz L, Burmester G-R, Kinne RW, Mueller-Ladner U, Muller B, Häupl T. Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis. *Histopathology* 2006;49:358–64.
- 105 Krenn V, Morawietz L, Häupl T, Neidel J, Petersen I, König A. Grading of chronic synovitis--a histopathological grading system for molecular and diagnostic pathology. *Pathol Res Pract* 2002;198:317–25.
- 106 Kuliwaba JS, Findlay DM, Atkins GJ, Forwood MR, Fazzalari NL. Enhanced expression of osteocalcin mRNA in human osteoarthritic trabecular bone of the

- proximal femur is associated with decreased expression of interleukin-6 and interleukin-11 mRNA. *J Bone Miner Res* 2000;15:332–41.
- 107 Kume K, Satomura K, Nishisho S, Kitaoka E, Yamanouchi K, Tobiume S, Nagayama M. Potential Role of Leptin in Endochondral Ossification. *J Histochem Cytochem* 2002;50:159–69.
 - 108 De Lange-Brokaar BJE, Ioan-Facsinay A, van Osch GJVM, Zuurmond A-M, Schoones J, Toes REM, Huizinga TWJ, Kloppenburg M. Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis Cartilage* 2012;20:1484–99.
 - 109 Largo R, Martínez-Calatrava MJ, Sánchez-Pernaute O, Marcos ME, Moreno-Rubio J, Aparicio C, Egido J, Herrero-Beaumont G. Effect of a high dose of glucosamine on systemic and tissue inflammation in an experimental model of atherosclerosis aggravated by chronic arthritis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297:H268–76.
 - 110 Largo R, Sánchez-Pernaute O, Marcos ME, Moreno-Rubio J, Aparicio C, Granado R, Ortega L, Egido J, Herrero-Beaumont G. Chronic arthritis aggravates vascular lesions in rabbits with atherosclerosis: a novel model of atherosclerosis associated with chronic inflammation. *Arthritis Rheum* 2008;58:2723–34.
 - 111 Li B, Aspden RM. Composition and mechanical properties of cancellous bone from the femoral head of patients with osteoporosis or osteoarthritis. *J Bone Miner Res* 1997;12:641–51.
 - 112 Li J. Managing Macrophages in Rheumatoid Arthritis by Reform or Removal. *Curr Rheumatol Rep* 2012;14:445–54.
 - 113 Li Y, Toraldo G, Li A, Yang X, Zhang H, Qian W-P, Weitzmann MN. B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass in vivo. *Blood* 2007;109:3839–48.

-
- 114 Lioté F, Boval-Boizard B, Weill D, Kuntz D, Wautier JL. Blood monocyte activation in rheumatoid arthritis: increased monocyte adhesiveness, integrin expression, and cytokine release. *Clin Exp Immunol* 1996;106:13–9.
- 115 Liu B, Yu S-F, Li T-J. Multinucleated giant cells in various forms of giant cell containing lesions of the jaws express features of osteoclasts. *J Oral Pathol Med* 2003;32:367–75.
- 116 Liu-Bryan R. Synovium and the innate inflammatory network in osteoarthritis progression. *Curr Rheumatol Rep* 2013;15:323.
- 117 Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum* 2012;64:1697–707.
- 118 Lopez-Pedrera C, Ruiz-Limon P, Valverde-Esteba A, Barbarroja N, Rodriguez-Ariza A. To cardiovascular disease and beyond: new therapeutic perspectives of statins in autoimmune diseases and cancer. *Curr Drug Targets* 2012;13:829–41.
- 119 Lories RJ, Luyten FP. The bone-cartilage unit in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2010;7:43–9.
- 120 Lukas C, van der Heijde D, Fatenajad S, Landewé R. Repair of erosions occurs almost exclusively in damaged joints without swelling. *Ann Rheum Dis* 2010;69:851–5.
- 121 Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased Inflammatory Properties of Adipose Tissue Macrophages Recruited During Diet-Induced Obesity. *Diabetes* 2007;56:16–23.
- 122 Lyons TJ, McClure SF, Stoddart RW, McClure J. The normal human chondro-osseous junctional region: evidence for contact of uncalcified cartilage with subchondral bone and marrow spaces. *BMC Musculoskelet Disord* 2006;7:52.

-
- 123 Lyons TJ, Stoddart RW, McClure SF, McClure J. The tidemark of the chondro-osseous junction of the normal human knee joint. *J Mol Histol* 2005;36:207–15.
- 124 Madry H, van Dijk CN, Mueller-Gerbl M. The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2010;18:419–33.
- 125 Maeda K, Takahashi N, Kobayashi Y. Roles of Wnt signals in bone resorption during physiological and pathological states. *J Mol Med (Berl)* 2013;91:15–23.
- 126 Makrygiannakis D, af Klint E, Catrina S-B, Botusan IR, Klareskog E, Klareskog L, Ulfgren A-K, Catrina AI. Intraarticular corticosteroids decrease synovial RANKL expression in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:1463–72.
- 127 Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* 1971;53:523–37.
- 128 Mansell JP, Bailey AJ. Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. *J Clin Invest* 1998;101:1596–603.
- 129 Martínez-Calatrava MJ, Largo R, Herrero-Beaumont G. Improvement of experimental accelerated atherosclerosis by chondroitin sulphate. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18 Suppl 1:S12–6.
- 130 Maruotti N, Cantatore FP, Crivellato E, Vacca A, Ribatti D. Macrophages in rheumatoid arthritis. *Histol Histopathol* 2007;22:581–6.
- 131 Mastbergen SC, Lafeber FPJG. Changes in subchondral bone early in the development of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2011;63:2561–3.
- 132 Mccarey DW, Mcinnes IB, Madhok R, Hampson R, Scherbakova O, Ford I, Capell HA, Sattar N. Trial of Atorvastatin in Rheumatoid Arthritis (TARA): double-blind , randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2004;363:2015–21.

-
- 133 McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011;365:2205–19.
- 134 McNally AK, Anderson JM. Interleukin-4 induces foreign body giant cells from human monocytes/macrophages. Differential lymphokine regulation of macrophage fusion leads to morphological variants of multinucleated giant cells. *Am J Pathol* 1995;147:1487–99.
- 135 McNally AK, Anderson JM. Macrophage fusion and multinucleated giant cells of inflammation. *Adv Exp Med Biol* 2011;713:97–111.
- 136 Mizuno K, Okamoto H, Horio T. Langhans-type more than foreign body-type multinucleated giant cells are induced from UVB-irradiated monocytes. *J Dermatol Sci* 2004;35:227–9.
- 137 Mobasheri A. The future of osteoarthritis therapeutics: emerging biological therapy. *Curr Rheumatol Rep* 2013;15:385.
- 138 Mooney RA, Sampson ER, Lerea J, Rosier RN, Zuscik MJ. High-fat diet accelerates progression of osteoarthritis after meniscal/ligamentous injury. *Arthritis Res Ther* 2011;13:R198.
- 139 Moreno-Rubio J, Herrero-Beaumont G, Tardio L, Alvarez-Soria MA, Largo R. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and prostaglandin E(2) modulate the synthesis of osteoprotegerin and RANKL in the cartilage of patients with severe knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:478–88.
- 140 Mulherin D, Fitzgerald O, Bresnihan B. Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996;39:115–24.
- 141 Murano I, Barbatelli G, Parisani V, Latini C, Muzzonigro G, Castellucci M, Cinti S. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res* 2008;49:1562–8.

-
- 142 Okayasu M, Nakayachi M, Hayashida C, Ito J, Kaneda T, Masuhara M, Suda N, Sato T HY. Low-density lipoprotein receptor deficiency causes impaired osteoclastogenesis and increased bone mass in mice because of defect in osteoclastic cell-cell fusion. *J Biol Chem* 2012;287:19229–41.
- 143 Pan J, Zhou X, Li W, Novotny JE, Doty SB, Wang L. In situ measurement of transport between subchondral bone and articular cartilage. *J Orthop Res* 2009;27:1347–52.
- 144 Paraskevas KI. Statin treatment for rheumatoid arthritis: a promising novel indication. *Clin Rheumatol* 2008;27:281–7.
- 145 Park JK, Askin F, Giles JT, Halushka MK, Rosen A, Levine SM. Increased generation of TRAP expressing multinucleated giant cells in patients with granulomatosis with polyangiitis. *PLoS One* 2012;7:e42659.
- 146 Park JK, Rosen A, Saffitz JE, Asimaki A, Litovsky SH, Mackey-Bojack SM, Halushka MK. Expression of cathepsin K and tartrate-resistant acid phosphatase is not confined to osteoclasts but is a general feature of multinucleated giant cells: systematic analysis. *Rheumatology (Oxford)* 2013;52:1529–33.
- 147 Pelton K, Krieder J, Joiner D, Freeman MR, Goldstein SA, Solomon KR. Hypercholesterolemia Promotes an Osteoporotic Phenotype. *Am J Pathol* 2012;181:1–9.
- 148 Perry M, Mustafa Y, Wood S, Cawley M. Binucleated and multinucleated forms of plasma cells in synovia from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 1997;17:169–74.
- 149 Pessler F, Dai L, Diaz-Torne C, Gomez-Vaquero C, Paessler ME, Zheng D-H, Einhorn E, Range U, Scanzello C, Schumacher HR. The synovitis of “non-inflammatory” orthopaedic arthropathies: a quantitative histological and immunohistochemical analysis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1184–7.

-
- 150 Pettit AR, Ji H, von Stechow D, Müller R, Goldring SR, Choi Y, Benoist C, Gravalles EM. TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. *Am J Pathol* 2001;159:1689–99.
- 151 Pettit AR, Walsh NC, Manning C, Goldring SR, Gravalles EM. RANKL protein is expressed at the pannus-bone interface at sites of articular bone erosion in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:1068–76.
- 152 Plenz A, Fritz P, König G, Laschner W, Saal JG. Immunohistochemical detection of factor XIIIa and factor XIIIb in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Rheumatol Int* 1996;16:29–36.
- 153 Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol* 2009;9:259–70.
- 154 Prieto-Potin I, Roman-Blas JA, Martinez-Calatrava MJ, Gomez R, Largo R, Herrero-Beaumont G. Hypercholesterolemia boosts joint destruction in chronic arthritis. An experimental model aggravated by foam macrophage infiltration. *Arthritis Res Ther* 2013;15:R81.
- 155 Prieur X, Mok CYL, Velagapudi VR, Núñez V, Fuentes L, Montaner D, Ishikawa K, Camacho A, Barbarroja N, O’Rahilly S, Sethi JK, Dopazo J, Orešič M, Ricote M, Vidal-Puig A. Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and M2/M1 polarization in obese mice. *Diabetes* 2011;60:797–809.
- 156 Quinn MT, Schepetkin IA. Role of NADPH oxidase in formation and function of multinucleated giant cells. *J Innate Immun* 2009;1:509–26.
- 157 Rahman MM, Kopec J a, Cibere J, Goldsmith CH, Anis AH. The relationship between osteoarthritis and cardiovascular disease in a population health survey: a cross-sectional study. *BMJ Open* 2013;3:e002624.

-
- 158 Revell PA, Mayston V, Lalor P, Mapp P. The synovial membrane in osteoarthritis: a histological study including the characterisation of the cellular infiltrate present in inflammatory osteoarthritis using monoclonal antibodies. *Ann Rheum Dis* 1988;47:300–7.
- 159 Rhodes LA, Conaghan PG, Radjenovic A, Grainger AJ, Emery P, McGonagle D. Further evidence that a cartilage-pannus junction synovitis predilection is not a specific feature of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1347–9.
- 160 Roman-Blas J. Proceedings of Osteorheumatology 2011 : International Congress on Bone Involvement in Arthritis. *Arthritis Res Ther* 2012;14:A6.
- 161 Romas E, Bakharevski O, Hards DK, Kartsogiannis V, Quinn JM, Ryan PF, Martin TJ, Gillespie MT. Expression of osteoclast differentiation factor at sites of bone erosion in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:821–6.
- 162 Romas E, Sims NA, Hards DK, Lindsay M, Quinn JWM, Ryan PFJ, Dunstan CR, Martin TJ, Gillespie MT. Osteoprotegerin reduces osteoclast numbers and prevents bone erosion in collagen-induced arthritis. *Am J Pathol* 2002;161:1419–27.
- 163 Romero FI, Martínez-Calatrava MJ, Sánchez-Pernaute O, Gualillo O, Largo R, Herrero-Beaumont G. Pharmacological modulation by celecoxib of cachexia associated with experimental arthritis and atherosclerosis in rabbits. *Br J Pharmacol* 2010;161:1012–22.
- 164 Sakakura Y, Tsuruga E, Irie K, Hosokawa Y, Nakamura H, Yajima T. Immunolocalization of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in Meckel's cartilage compared with developing endochondral bones in mice. *J Anat* 2005;207:325–37.
- 165 Sattar N, McCarey DW, Capell H, McInnes IB. Explaining how “high-grade” systemic inflammation accelerates vascular risk in rheumatoid arthritis. *Circulation* 2003;108:2957–63.

-
- 166 Schett G, Gravallesse E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:1–9.
- 167 Schett G, Hayer S, Zwerina J, Redlich K, Smolen JS. Mechanisms of Disease: the link between RANKL and arthritic bone disease. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2005;1:47–54.
- 168 Schett G. Synovitis--an inflammation of joints destroying the bone. *Swiss Med Wkly* 2012;142:w13692.
- 169 Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:625–35.
- 170 Sellam J, Herrero-beaumont G, Berenbaum F. Osteoarthritis : pathogenesis , clinical aspects and diagnosis. In: *EULAR textbook on rheumatic diseases*. Berlin. 2009: 444–63.
- 171 Shibakawa A. Presence of pannus-like tissue on osteoarthritic cartilage and its histological character. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11:133–40.
- 172 Shigeyama Y, Pap T, Kunzler P, Simmen BR, Gay RE, Gay S. Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:2523–30.
- 173 Shishido-Hara Y, Kurata A, Fujiwara M, Itoh H, Imoto S, Kamma H. Two cases of breast carcinoma with osteoclastic giant cells: are the osteoclastic giant cells pro-tumoural differentiation of macrophages? *Diagn Pathol* 2010;5:55.
- 174 Shoenfeld Y, Gerli R, Doria A, Matsuura E, Cerinic MM, Ronda N, Jara LJ, Abu-Shakra M, Meroni PL, Sherer Y. Accelerated atherosclerosis in autoimmune rheumatic diseases. *Circulation* 2005;112:3337–47.
- 175 Shu SY, Ju G, Fan LZ. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci Lett* 1988;85:169–71.

-
- 176 Silman AJ, Hochberg MC. Descriptive Epidemiology of Rheumatoid Arthritis. In: *Rheumatoid arthritis*. Philadelphia. 2009: 15–23.
- 177 Singh G, Miller JD, Lee FH, Pettitt D, Russell MW. Prevalence of Cardiovascular Disease Risk Factors Among US Adults With Self-Reported Osteoarthritis: Data From the Third National Health and Nutrition Examination Survey Gurkirpal. *Am J Manag Care* 2002;8:383–91.
- 178 Skjøt-Arkil H, Barascuk N, Larsen L, Dziegiel M, Henriksen K, Karsdal MA. Tumor necrosis factor-alpha and receptor activator of nuclear factor-κB ligand augment human macrophage foam-cell destruction of extracellular matrix through protease-mediated processes. *Assay Drug Dev Technol* 2012;10:69–77.
- 179 Smolen JS, Redlich K, Zwerina J, Aletaha D, Steiner G, Schett G. Pro-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis: pathogenetic and therapeutic aspects. *Clin Rev Allergy Immunol* 2005;28:239–48.
- 180 Smolen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:473–88.
- 181 Soren A, Waugh TR. The giant cells in the synovial membrane. *Ann Rheum Dis* 1981;40:496–500.
- 182 Steiner G, Tohidast-Akrad M, Witzmann G, Vesely M, Studnicka-Benke A, Gal A, Kunaver M, Zenz P, Smolen JS. Cytokine production by synovial T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 1999;38:202–13.
- 183 Stürmer T, Sun Y, Sauerland S, Zeissig I, Günther KP, Puhl W, Brenner H. Serum cholesterol and osteoarthritis. The baseline examination of the Ulm Osteoarthritis Study. *J Rheumatol* 1998;25:1827–32.
- 184 Sulzbacher I. Osteoarthritis: histology and pathogenesis. *Wien Med Wochenschr* 2013;163:212–9.

-
- 185 Szekanecz Z, Koch AE. Vascular involvement in rheumatic diseases: “vascular rheumatology”. *Arthritis Res Ther* 2008;10:224.
- 186 Tak PP, Smeets TJM, Daha MR, Kluin PM, Meijers KAE, Brand R, Meinders AED, Breedveld FC. Analysis of the synovial cell infiltrate in relation to local disease activity. *Arthritis Rheum* 1997;40:217–25.
- 187 Tauber AI. Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:897–901.
- 188 Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 2003;4:638–49.
- 189 Tintut Y, Morony S, Demer LL. Hyperlipidemia promotes osteoclastic potential of bone marrow cells ex vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:e6–10.
- 190 Tiraloché G, Girard C, Chouinard L, Sampalis J, Moquin L, Ionescu M, Reiner A, Poole A R, Lavery S. Effect of oral glucosamine on cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52:1118–28.
- 191 Usui M, Xing L, Drissi H, Zuscik M, O’Keefe R, Chen D, Boyce BF. Murine and chicken chondrocytes regulate osteoclastogenesis by producing RANKL in response to BMP2. *J Bone Miner Res* 2008;23:314–25.
- 192 VanFurth R. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Heal Organ* 1972;46:845–52.
- 193 Vignery A. Macrophage fusion: the making of osteoclasts and giant cells. *J Exp Med* 2005;202:337–40.
- 194 Villalvilla A, Gómez R, Largo R, Herrero-Beaumont G. Lipid Transport and Metabolism in Healthy and Osteoarthritic Cartilage. *Int J Mol Sci* 2013;14:20793–808.

-
- 195 Walsh NC, Crotti TN, Goldring SR, Gravallesse EM. Rheumatic diseases: the effects of inflammation on bone. *Immunol Rev* 2005;208:228–51.
- 196 Walsh NC, Reinwald S, Manning CA, Condon KW, Iwata K, Burr DB, Gravallesse EM. Osteoblast function is compromised at sites of focal bone erosion in inflammatory arthritis. *J Bone Miner Res* 2009;24:1572–85.
- 197 Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* 2011;17:1410–22.
- 198 Weinberg JB, Hobbs MM, Misukonis MA. monocyte polykaryons. *Blood* 1985;66:1241–6.
- 199 Weinberg JB, Wortham TS, Misukonis M a, Patton KL, Chitneni SR. Synovial mononuclear phagocytes in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: quantitative and functional aspects. *Immunol Invest* 1993;22:365–74.
- 200 Wilkinson LS, Pitsillides a a, Edwards JC. Giant cells in arthritic synovium. *Ann Rheum Dis* 1993;52:182–4.
- 201 Wu H, Gower RM, Wang H, Perrard X-YD, Ma R, Bullard DC, Burns AR, Paul A, Smith CW, Simon SI, Ballantyne CM. Functional role of CD11c+ monocytes in atherogenesis associated with hypercholesterolemia. *Circulation* 2009;119:2708–17.
- 202 Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, O’Brien CA. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med* 2011;17:1235–41.
- 203 Yuan G. Characterization of cells from pannus-like tissue over articular cartilage of advanced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12:38–45.
- 204 Zhang X, Mosser D. Macrophage activation by endogenous signals. *Cell* 2009;214:161–78.

- 205 Zhao B, Ivashkiv LB. Negative regulation of osteoclastogenesis and bone resorption by cytokines and transcriptional repressors. *Cytokines* 2011;1:1–10.
- 206 Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJM, Liu Y-J, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 2010;116:e74–80.

VIII. Aportaciones científicas

Los resultados de esta tesis han sido parcialmente publicados en:

Prieto-Potin I, Largo R, Roman-Blas JA, Herrero-Beaumont G, Walsh DA. Multinucleated giant cells in synovia from people with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. Ann Rheum Dis 2014. In preparation.

Prieto-Potin I, Roman-Blas JA, Martinez-Calatrava MJ, Gomez R, Largo R, Herrero-Beaumont G. Hypercholesterolemia boosts joint destruction in chronic arthritis. An experimental model aggravated by foam macrophage infiltration. Arthritis Res Ther 2013; 15: R81.

Martinez-Calatrava MJ, **Prieto-Potín I**, Roman-Blas JA, Tardio L, Largo R, Herrero-Beaumont G. RANKL synthesized by articular chondrocytes contributes to juxta-articular bone loss in chronic arthritis. Arthritis Res Ther 2012; 14: R149.

Otros trabajos publicados durante el desarrollo de la tesis son:

Prieto-Potin I, Largo R, Roman-Blas JA, Walsh DA, Herrero-Beaumont G. Subchondral bone remodelling from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Ann Rheum Dis 2014. In preparation.

Martínez-Calatrava MJ, Largo R, **Prieto-Potín I**, Herrero-Beaumont G. Synovial inflammation in an experimental model of metabolic syndrome in the rabbit. Trauma Fund MAPFRE 2011; 22: 22-26.

Los resultados han sido también presentados en las siguientes reuniones científicas:

Abstracts of ECTS 2014, 41st Annual Congress, Prague, the Czech Republic (May 17-20, 2014)

Prieto-Potin I, Largo R, Roman-Blas JA, Herrero-Beaumont G, Walsh DA. Multinucleated giant cells in synovia from people with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. Bone 2014. Submitted

Abstracts of ECTS 2012, 39th Annual Congress, Stockholm, Sweden (May 19-23, 2012)

Prieto-Potin I, Martínez-Calatrava MJ, Román-Blas JA, Tardio L, Largo R, Herrero-Beaumont G. Does RANKL produced by articular chondrocytes actively participate in juxta-articular bone loss related to chronic arthritis? *Bone* 2012; 50: S97

Abstracts of the 2012 World Congress on Osteoarthritis April 26 - 29, 2012 Barcelona, Spain

Prieto-Potin I, Martínez-Calatrava MJ, Román-Blas JA, Largo R, Tardío L, Herrero-Beaumont G. Rankl produced by articular chondrocytes induces bone loss associated with arthropathies. *Osteoarthritis and Cartilage* 2012; 20: S65-S66.

32nd European Workshop for Rheumatology Research February 23–25, 2012 Stockholm, Sweden

Martínez-Calatrava MJ, **Prieto-Potín I**, Roman-Blas J, Tardio L, Largo R, Herrero-Beaumont G. Rankl produced by articular chondrocytes contributes to juxta-articular bone loss in chronic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2012; 71 Suppl 1: A1-A93.